

Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii



Ewelina Kiernożek

***Rola glukokortykoidów w rozwoju i funkcji
naturalnych regulatorowych limfocytów T***

rozprawa doktorska

Promotor rozprawy

dr hab. prof. UW Nadzieja Drela

Zakład Immunologii

Instytut Zoologii

Wydział Biologii UW

Wrzesień 2013

Oświadczenie autora rozprawy:

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

data

podpis autora rozprawy

Oświadczenie promotora rozprawy:

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

data
rozprawy

podpis

promotora



Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi mojej pracy prof. dr hab. Nadziei Dreli

*za opiekę naukową, szereg cennych wskazówek, wyrozumiałość i cierpliwość
oraz nieograniczoną pomoc w trakcie pisania tej pracy*

mgr Annie Kowalik

za wsparcie oraz pomoc dniem i nocą w trakcie wykonywania badań

Wszystkim Pracownikom Zakładu Immunologii i Znajomym

za cenne wskazówki, życzliwość i wspaniałą atmosferę w pracy

dr Magdalenie Markowskiej

oraz zespołowi z Zakładu Fizjologii Zwierząt

za okazaną pomoc i umożliwienie przeprowadzenia części badań

Wszystkim moim Bliskim i Przyjaciołom

za wszechstronną pomoc, wsparcie i motywację



Finansowanie badań

2009 – 2012: Grant nr N303 395836, Zmiany w rozwoju i funkcji naturalnych regulatorowych limfocytów T CD4+CD25+ w przebiegu starzenia, kierownik projektu: dr hab. Nadzieja Drela, prof. UW

2011 – 2013: Grant promotorski nr N N303 819940 Porównanie aktywności supresyjnej naturalnych regulatorowych limfocytów T CD4+CD25+Foxp3+ myszy o profilu odpowiedzi immunologicznej Th1 i Th2, kierownik projektu: dr hab. Nadzieja Drela, prof. UW

Wydział Biologii UW – Projekty Badań Własnych

2010 – 2011: BW 601/86 -191113 Opracowanie metody przyżyciowego badania ekspresji receptorów dla glukokortykoidów techniką cytometrii przepływowej, kierownik projektu: Ewelina Kiernozek

2011 – 2012: BW 601/86 -100018 Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w populacji tymocytów podwójnie negatywnych CD4-CD8- myszy o profilu odpowiedzi immunologicznej Th1 i Th2, kierownik projektu: Ewelina Kiernozek

Wyniki przedstawione w pracy zostały zawarte w następujących publikacjach i doniesieniach konferencyjnych

Prace

Kowalik A., **Kiernożek E.**, Mariusz Kulinczak M., Brodaczewska K., Kozłowska E., Gieczewska K., Riccardi C., Nadzieja Drela. Dexamethasone-FITC staining application for measurement of circadian rhythmicity of glucocorticoid receptor expression in mouse living thymocyte subsets. *Journal of Neuroimmunology* 2013, 261: 44–52

Kiernożek E., Kowalik A., Markowska M., Kozłowska E. i Drela N. Wpływ glikokortykoidów na odsetek naturalnych regulatorowych limfocytów T. *Nowe Trendy w Naukach Przyrodniczych*. Tom II. 2012 str. 65 – 71.

Kiernożek E., Kowalik A. i Drela N. Wpływ glikokortykoidów na rozwój tymocytów. *Młodzi Naukowcy dla Polskiej Nauki, Część II. Nauki Przyrodnicze*. Tom II, 2012 str. 83 – 92.

Kowalik A., **Kiernożek E.** i Drela N. Zastosowanie komórek dendrytycznych JAWSII w badaniach rozwoju i aktywności supresorowej naturalnych regulatorowych limfocytów T. *Nowe Trendy w Naukach Przyrodniczych*. Tom II. 2012, str. 51- 59.

Streszczenia opublikowane w czasopismach międzynarodowych

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. A new method for measuring the expression of intracellular glucocorticoid receptors in living thymocytes by flow cytometry. XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 20-23.09.2010, Wisła, *Acta Biochemica Polonica*, 57 (Suppl. 4) str. 7.

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Content of natural regulatory T cells in thymus correlates with the circadian rhythm of glucocorticoids synthesis. BSI Congress 2010 6-10.12.2010, Liverpool, *Immunology*, 131 (Suppl. 1) str. 54-55.

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Glucocorticoid-dependent suppressive function and context of thymic natural regulatory T cells in C57BL/6 mice. XXV Kongresu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego 15-17.09.2011, Olsztyn, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62 (Suppl. 1) str. 180.

Kowalik A., **Kiernożek E.**, Kozłowska E. and Drela N. Glucocorticoids in proliferation and differentiation of thymocytes *in vitro*. XXV Kongresu Polskiego Towarzystwa

Fizjologicznego 15-17.09. 2011, Olsztyn, Jurnal of Physiology and Pharmacology, 62 (Suppl. 1) str. 181.

Kiernożek E., Kowalik A., Niedzielska K., Markowska M., Drela N., Diurnal changes in trafficking receptor expression on thymus-deriving natural regulatory T cells. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI) 22-27.08.2013, Milano, Frontiers in Immunology doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00746.

Kowalik A., Gugala K., **Kiernożek E.**, Kozłowska E., Drela N., Dexamethasone dose-dependent effect on nTreg generation in vitro in thymocytes co-cultures with JAWSII cells. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI) 22-27.08.2013, Milano, Frontiers in Immunology doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00950.

Doniesienia zjazdowe (prezentacje ustne):

Kiernożek E., Kowalik A. Cytokiny i glikokortykoidy w różnicowaniu tymocytów ze szczególnym uwzględnieniem naturalnych regulatorowych limfocytów T. Ogólnopolska Konferencja skierowała do doktorantów, asystenów oraz doktorów do 3 lat po obronie. „Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki” 3.12.2011, Wrocław

Doniesienia zjazdowe (postery):

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Differential content of natural regulatory T cells in the thymus of BALB/c and C57BL/6 mice. 1-st Congress of Polish Society of Cytometry 12-15.05.2010, Kazimierz Dolny.

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. A new method for measuring the expression of intracellular glucocorticoid receptors in living thymocytes by flow cytometry. XLV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 20-23.09.2010, Wisła.

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Differential content of natural regulatory T cells in the thymus of BALB/c and C57BL/6 mice. COINS 2010- Annual International Students`Conference of Nature Sciences 21-25.09.2010, Wilno.

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Content of natural regulatory T cells in thymus correlates with the circadian rhythm of glucocorticoids synthesis. BSI Congress 2010 6-10.12.2010, Liverpool

Kowalik A., **Kiernożek E.**, Kozłowska E. , Zapała Ł. , Lasek W., Drela N. Survival and proliferation of thymus-deriving regulatory T cells: *in vitro* culture with JAWS II cell line. XLV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Immunologów Doświadczalnych i Klinicznych 16-18.06.2011, Gdańsk

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. A new method for measuring the expression of intracellular glucocorticoid receptors in living thymocytes by flow cytometry. XLV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Immunologów Doświadczalnych i Klinicznych 16-18.06.2011, Gdańsk

Kiernożek E., Kozłowska E., Markowska M., Kowalik A. and Drela N. Glucocorticoid-dependent suppressive function and context of thymic natural regulatory T cells in C57BL/6 mice. XXV Kongresu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego 15-17.09.2011, Olsztyn

Kowalik A., **Kiernożek E.**, Kozłowska E. and Drela N. Glucocorticoids in proliferation and differentiation of thymocytes *in vitro*. XXV Kongresu Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego 15-17.09.2011, Olsztyn

Kowalik A., **Kiernożek E.**, Kozłowska E., Drela N. Activatory signals, cytokines and hormones in differentiation of natural regulatory T cells in vitro models. 8th International Congress on Autoimmunity 9-13.05.2012, Granada

Kiernożek E., Kowalik A., Kozłowska E., Drela N. Dexamethasone – induced changes in the content of thymic CD4+CD25+FOXP3+cells in young and old C57BL/6 mice. 8th International Congress on Autoimmunity 9-13.05.2012, Granada

Kiernożek E., Kowalik A., Kozłowska E., Drela N. Glucocorticoid – dependent suppressive function of thymic natural regulatory T cells in C57BL/6 mice. 8th International Congress on Autoimmunity 9-13.05.2012, Granada

Kiernożek E., Kowalik A., Markowska M., Niedzielska K., Świdorska E., Drela N. Expression of glucocorticoid receptors and suppressive activity of thymic natural regulatory T cells in C57BL/6 mice dependent on circadian rhythm of GCs synthesis. II Zjazd Polskiego Towarzystwa Cytometrii 7-8.09.2012 Kazimierz Dolny

Kiernożek E., Kowalik A., Niedzielska K., Markowska M., Drela N., Diurnal changes in trafficking receptor expression on thymus-deriving natural regulatory T cells. Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI) doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00746, 22-27.08.2013, Milano

Kowalik A., Gugala K., **Kiernożek E.**, Kozłowska E., Drela N., Dexamethasone dose-dependent effect on nTreg generation in vitro in thymocytes co-cultures with JAWSII cells. Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI) doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00950, 22-27.08.2013, Milano

Wykaz stosowanych skrótów.....	11
1. STRESZCZENIE	14
2. WSTĘP	16
2.1 Limfocyty T regulatorowe	17
2.2 Powstawanie naturalnych regulatorowych limfocytów T.....	18
2.3 Charakterystyka fenotypowa naturalnych regulatorowych limfocytów T.....	23
2.3.1 CD25 – podjednostka α receptora dla interleukiny 2	24
2.3.2 Czynn timeranskrypcyjny Foxp3	25
2.4 Mechanizmy supresji z udziałem nTreg.....	28
2.4.1 Cytokiny w aktywności supresorowej limfocytów nTreg	28
2.4.2 Cytotoksyczność.....	29
2.4.3 Zaburzenia metaboliczne w indukcji supresji.....	30
2.4.4 Supresja za pośrednictwem komórek dendrytycznych	31
2.5 Rola limfocytów nTreg w immunosupresji	33
2.6 Glukokortykoidy	35
2.6.1 Mechanizm działania glukokortykoidów na przebieg odpowiedzi immunologicznej	35
2.6.2 Działanie glukokortykoidów na poziomie molekularnym.....	36
2.6.3 Rola glukokortykoidów w układzie odpornościowym	38
2.6.4 Wpływ glukokortykoidów na komórki układu odpornościowego	39
2.6.5 Wpływ glukokortykoidów na równowagę Th1/Th2 w układzie odpornościowym.....	41
2.6.6 Udział glukokortykoidów w rozwoju tymocytów.....	41
2.6.7 Wpływ glukokortykoidów na limfocyty nTreg zależny od płci.....	43
3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	45
4. MATERIAŁY I METODY.....	48
4.1 Zwierzęta	48

4.2 Schemat badań.....	48
4.3 Pobieranie materiału do badań.....	50
4.4 Określanie fenotypu głównych populacji tymocytów oraz naturalnych regulatorowych limfocytów T.....	50
4.5 Oznaczanie poziomu apoptozy w populacji tymocytów.....	51
4.6 Analiza ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w populacjach tymocytów...	51
4.7 Określenie aktywności supresorowej nTreg w teście hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów T węzłów chłonnych.....	51
4.7.1 Sortowanie nTreg	53
4.8 Oznaczenie stężenia kortykosteronu i deksametazonu w osoczu krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA.....	53
4.9 Analiza statystyczna wyników.....	54
5. WYNIKI	55
5.1 Analiza rozwoju głównych populacji tymocytów i naturalnych regulatorowych limfocytów T.....	55
5.1.1 Rozkład głównych populacji tymocytów w zależności od pory dnia.....	57
5.1.2 Rozkład naturalnych regulatorowych limfocytów T w zależności od pory dnia	59
5.1.3 Analiza poziomu apoptozy tymocytów w zależności od pory dnia	65
5.1.4 Aktywność supresorowa nTreg w zależności od pory dnia.....	67
5.1.5 Stężenie kortykosteronu w zależności od pory dnia	69
5.1.6 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach w zależności od pory dnia.....	70
5.2 Wpływ deksametazonu na rozwój głównych populacji tymocytów i naturalnych regulatorowych limfocytów T.....	72
5.1.1 Wpływ deksametazonu na rozkład głównych populacji tymocytów.....	72
5.1.2 Wpływ deksametazonu na rozkład naturalnych regulatorowych limfocytów T.	75
5.1.3 Poziom apoptozy tymocytów w grasicach myszy traktowanych deksametazonem.....	83
5.1.4 Aktywność supresorowa nTreg myszy traktowanych deksametazonem.....	86
5.1.5 Stężenie glukokortykoidów w osoczu myszy traktowanych deksametazonem..	88

5.1.6 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach myszy traktowanych deksametazonem	90
6. DYSKUSJA.....	93
6.1 Rozwój naturalnych regulatorowych limfocytów T wykazuje zmienność zależną od pory dnia	93
6.2 Naturalne regulatorowe limfocyty T wykazują zmienną aktywność supresorową zależną od pory	98
6.3 Deksametazon wzmacnia zależne od pory dnia zmiany w rozwoju nTreg zachodzące w warunkach fizjologicznych	100
6.2 Deksametazon zwiększa aktywność supresorową nTreg nie zmieniając jej rytmiczności obserwowanej w warunkach fizjologicznych	102
7. WNIOSKI.....	110
8. BIBLIOGRAFIA.....	111

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- A_{2A}R** (adenosine receptor 2A) – receptor adenozynowy 2A
- Ab** (antibody) - przeciwciało
- ACTH** (adrenocorticotrophic hormone) – hormone adrenokortykotropowy, kortykotropina
- AKT** (protein kinase B) - kinaza białkowa B
- AMI** (acute myocardial infarction) – ostry zawał mięśnia sercowego
- AP1** (activating protein-1) – białko aktywujące 1, czynnik transkrypcyjny AP1
- APC** (antigen presenting cell) – komórka prezentująca antygen
- Bcl** (B cell lymphoma) – białko należące do rodziny białek antyapoptycznych
- cAMP** (cyclic adenosine monophosphate) – cykliczny adenozynomonofosforan
- CARMA1** (CARD-containing MAGUK protein 1) – białko CARMA 1
- CD** (cluster of differentiation) – kompleks różnicowania
- CFSE** (carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester) – ester sukcyνοimidu dioctanu karboksylfluoresceiny
- cGCR** (cytoplasmic glucocorticoid receptor) – cytoplazmatyczny receptor dla glukokortykoidów
- CLP** (common lymphoid progenitors) – komórka progenitorowa szpiku kostnego
- CNS3** (conserved non-coding sequence 3) – konserwatywna sekwencja nie kodująca 3
- cREL** (transcription factor of NF-κB transcription factor family) – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny czynników NF-κB
- CRH** (corticotropin-releasing hormone) – hormon uwalniający kortykotropinę, kortykoliberyna
- cTEC** (cortical thymic epithelial cell) – korowe komórki nabłonkowe grasicy
- CTLA-4** (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4) – antygen 4 związany z limfocytą T cytotoksycznym
- DAG** (diacylglycerol) – diacyloglicerol
- DC** (dendritic cell) – komórka dendrytyczna
- Dex** (dexamethasone) – deksametazon
- DN** (double negative) – podwójnie negatywny
- DP** (double positive) – podwójnie pozytywny
- DR5** (death receptor) – receptor śmierci
- EAE** (experimental autoimmune encephalomyelitis) – doświadczalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia
- ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny
- ER** (endoplasmic reticulum) – retikulum endoplazmatyczne
- ERK** (extracellular signal- regulated kinase) – kinaza ERK

FBS (fetal bovine serum) – płodowa surowica bydlęca

FOXO (forkhead box O) – czynnik transkrypcyjny FOXO

Foxp3 (forkhead box P3) – czynnik transkrypcyjny z rodziny forkhead

GC (glucocorticoids) - glukokortykoidy

GCR (glucocorticoid receptor) – receptor dla glukokortykoidów

GFP (green fluorescent protein) – białko wykazujące zieloną fluorescencję

GITR (glucocorticoid induced TNF-family receptor) – receptor dla cząsteczek TNF-podobnych indukowany glukokortykoidami

GRE (glucocorticoid response element) – region odpowiedzi na glukokortykoidy

GvHD (graft versus host disease) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi

HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) – oś podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowa

HPG (hypothalamic–pituitary–gonadal) – oś podwzgórzowo – przysadkowo – gonadalna

Hsp (heat shock proteins) – białka szoku cieplnego

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) – cząsteczka adhezji komórkowej

IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) – idoalanina 2,3-dioksygenazy

IFN (interferon) – interferon

Ig (immunoglobulin) – immunoglobulina

IKK β (I κ B kinase) – kinaza I κ B

IL (interleukin) – interleukina

InsP₃ (inositol-1,4,5-trisphosphate) – trifosforan-1,4,5 inozytolu

IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) – sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii, enteropatii)

IRF (IFN-gene regulatory factor) – czynnik regulujący gen dla interferonu

ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) – motyw immunoreceptorowy hamujący oparty na tyrozynie, sekwencja ITAM

iTreg (induced regulatory Tcell) – indukowany regulatorowy limfocyt T

LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) - gen aktywacji limfocytów

LAT (linker for activation of T cells) – łącznik dla pobudzonych limfocytów T, białko adaptorowe LAT

mAb (monoclonal antibody) – przeciwciało monoklonalne

MALT (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) – tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi

MAPK (mitogen-activated protein kinase) – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny

2ME (mercaptoethanol) – 2-merkaptoetanol

mGCR (membrane glucocorticoid receptor) – błonowy receptor dla glukokortykoidów

MHC (major histocompatibility complex) – główny układ zgodności tkankowej

mTOR (mammalian target of rapamycin kinase) – ssaczy cel rapamycyny

NFAT (nuclear factor of activated T cells) – czynnik transkrypcyjny NFAT

NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – czynnik transkrypcyjny NF-κB

NKT (natural killer T cell) – naturalny cytotoksyczny limfocyt T

Nrp1 (neuropilin 1) – neuropilina 1

nTreg (natural regulatory T cell) – naturalny regulatorowy limfocyt T

OxLDL (oxidized low density lipoprotein) – oksydowane lipoproteiny niskiej gęstości

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) – kinaza-3 fosfatydoinozytolu

PKCθ (protein kinase C) – kinaza białkowa C

PLCγ (phospholipase) – fosfolipaza C

SCF (stem cell factor) – czynnik wzrostowy komórek macierzystych

SCN (suprachiasmatic nucleus) – jądra nadskrzyżowaniowe

SFN (scurfin) – skurfina

SHP-1 (protein tyrosine phosphatase 1) – białko fosfatazy tyrozynowej 1

SP (single positive) – pojedynczo pozytywny

STIM (stromal interaction molecule) – cząsteczki stromalnej interakcji, sensory jonów Ca^{2+} wewnątrz ER

TAK 1 (TGFβ-activated kinase 1) – kinaza aktywująca TGFβ, kinaza TAK 1

TCR (T-cell receptor) – receptor limfocyta T

TGF-β (transforming growth factor β) – transformujący czynnik wzrostu β

Th (helper T cell) – limfocyt T pomocniczy

TLR (Toll-like receptors) – receptory Toll-podobne

TNF (tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworu

Tr1 (type 1 regulatory T cell) – limfocyt T regulatorowy typu 1

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) – ligand wywołujący apoptozę poprzez aktywację receptorów z rodziny TNF

Treg (regulatory T cell) – limfocyt T regulatorowy

Ts (suppressor T cell) – limfocyt T supresorowy

1. STRESZCZENIE

Wiele procesów fizjologicznych zachodzących w organizmie podlega cyklicznym (24h) zmianom, zwanymi rytmem okołodobowym. Aktywność układu odpornościowego również wykazuje rytmiczne zmiany zależne od pory dnia, które podlegają regulacji przez układ nerwowy i endokrynowy. Jednym z lepiej poznanych mechanizmów biorących udział w regulacji układu odpornościowego jest oś podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowa (HPA). Pod kontrolą osi HPA w rytmie okołodobowym zachodzi synteza glukokortykoidów (GC). Największy poziom wydzielania GC przypada na początek fazy aktywności organizmu, który u myszy występuje wieczorem natomiast u ludzi rano. Zarówno glukokortykoidy jak i naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg) o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pełnią ważną rolę w kontroli aktywności poziomu odpowiedzi immunologicznej. Glukokortykoidy, ze względu na swoje silne właściwości immunosupresyjne i przeciwzapalne są powszechnie stosowane w leczeniu chorób związanych z nadmierną aktywnością układu odpornościowego. Stosowane są w terapii chorób autoimmunizacyjnych, alergiach, ostrych i przewlekłych stanach zapalnych, czy odpowiedzi przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD). Jednakże ich działanie jest niespecyficzne, a długoterminowe stosowanie wywołuje stan ogólnoustrojowej immunosupresji, co przyczynia się to obniżenia odporności organizmu.

Limfocyty nTreg powstają w grasicy, jednak dokładny mechanizm ich różnicowania i dojrzewania pozostaje nadal niejasny. Wskazuje się udział glukokortykoidów w tym procesie. Głównym źródłem syntezy endogennych glukokortykoidów jest kora nadnerczy. GC są także syntetyzowane przez korowe komórki nabłonkowe grasicy (cTEC) oraz limfocyty T i B. Z dobowym rytmem syntezy GC związany jest okołodobowy rytm migracji leukocytów, aktywacji i funkcji efektorowych komórek układu odpornościowego. Komunikację pomiędzy układem hormonalnym a odpornościowym zapewniają receptory dla hormonów, w tym receptory dla glukokortykoidów (GCR) występujące w oraz na komórkach odpornościowych.

Wskazuje się również na pozytywny udział glukokortykoidów w przeżywalności nTreg i indukcji syntezy czynnika transkrypcyjnego Foxp3 odpowiadającego za powstawanie i funkcje supresorowe limfocytów nTreg. Wykazano także mniejszą wrażliwość limfocytów nTreg na apoptozę indukowaną przez syntetyczne glikokortykoidy w porównaniu z pozostałymi populacjami tymocytów.

Na podstawie dostępnych wyników badań dokumentujących udział GC i osi HPA w regulacji funkcji układu odpornościowego oraz jego zmiennej aktywności zależnej od pory dnia, sformułowano następującą hipotezę badawczą:

Rozwój i aktywność supresorowa naturalnych regulatorowych limfocytów T wykazuje rytmiczność zależną od pory dnia. Rytmiczne zmiany aktywności supresorowej limfocytów nTreg uczestniczą w zmiennej aktywności układu odpornościowego zależnej od pory dnia. W procesie rozwoju i regulacji rytmicznych zmian aktywności supresorowej limfocytów nTreg uczestniczą glukokortykoidy.

Badania przeprowadzono w dwóch etapach. Celem pierwszego była weryfikacja hipotezy zakładającej występowanie rytmiczności rozwoju nTreg w dwóch wybranych punktach czasowych odpowiadających najmniejszemu i największemu stężeniu endogennych glukokortykoidów. Porównano etapy rozwoju głównych populacji tymocytów oraz nTreg dwóch prototypowych szczepów myszy obu płci C57BL/6 i BALB/c różniących się typem odpowiedzi immunologicznej, odpowiednio Th1 i Th2. Celem drugiego etapu była weryfikacja hipotezy zakładającej regulację rozwoju i aktywności supresorowej nTreg przez glukokortykoidy. W badaniach wykorzystano wyżej wymienione szczepy myszy, które traktowano syntetycznym glukokortykoidem – deksametazonem przez dootrzewnowe wstrzyknięcie dwóch wybranych dawek: 1.25 µg/kg/dobę i 1.25 mg/kg/dobę.

Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę badawczą, wykazano: 1/ rytmiczność rozwoju i aktywności supresorowej nTreg zależną od pory dnia; 2/ rytmiczne zmiany ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w limfocytach nTreg zachodzące zgodnie z rytmem najmniejszego i największego stężenia endogennych glukokortykoidów; 3/ działanie syntetycznego glukokortykoidu – deksametazonu zwiększa odsetek nTreg w grasicy i ich aktywność supresorową przy zachowaniu rytmiczności zależnej od pory dnia obserwowanej w warunkach fizjologicznych.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano potencjalny mechanizm regulacji aktywności układu odpornościowego odpowiedzialny za rytmiczne zmiany zależne od pory dnia. Mechanizm ten zakłada udział limfocytów nTreg, których rozwój i funkcje podlegają regulacji przez GC za pośrednictwem receptorów dla GC.

2. WSTĘP

Walter B. Cannon, twórca pojęcia „homeostazy” podkreśla w swojej książce „The Wisdom of the Body”, że kiedy znany jest czynnik, który może przesunąć stan homeostazy w jednym kierunku, uzasadnione jest szukanie czynnika lub czynników mających przeciwstawne działanie. Tak jest również w przypadku układu odpornościowego. Podczas efektywnej odpowiedzi immunologicznej na antygeny obce zachowana jest kontrola nadmiernej reaktywności na antygeny obce i tolerancja na antygeny własne. W utrzymaniu tej równowagi uczestniczą limfocyty T regulatorowe (Treg), które hamują aktywność limfocytów T efektorowych [1]. W 1970 Gershon i Kondo po raz pierwszy opisali właściwości supresorowe limfocytów T regulatorowych (zwanych pierwotnie również limfocytami T supresorowymi – Ts) [2]. Nie udało się im jednak zidentyfikować czynników odpowiedzialnych za funkcje tych komórek. Dopiero w połowie lat 90-tych wykazano w obwodowych narządach limfoidalnych limfocyty charakteryzujące się konstytutywną ekspresją łańcucha α receptora dla IL-2 (CD25) odpowiedzialne za utrzymanie tolerancji immunologicznej *in vivo* [3]. Limfocyty te nazwano limfocytami T regulatorowymi (Treg) i opisano ich rolę w kontroli odpowiedzi immunologicznej, która polega głównie na utrzymaniu tolerancji na własne antygeny i hamowaniu nadmiernej odpowiedzi immunologicznej na antygeny konwencjonalne [4]. Zaobserwowane już wcześniej u ludzi różnice w aktywności układu odpornościowego zależne od pory dnia [5] sugerują, iż przynajmniej jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za taką rytmiczność może być związany z funkcją supresorowych limfocytów T.

Wiele procesów fizjologicznych podlega cyklicznym (24h) zmianom, zwanymi rytmami okołodobowymi, które generowane są przez zegar okołodobowy usytuowany w jądrze nadskrzyżowaniowym – SCN (suprachiasmatic nucleus) i tkankach obwodowych [6]. Fizjologiczną rolą systemu okołodobowego jest koordynacja i dostosowanie reakcji różnych narządów do dynamicznych zmian środowiska. Taka synchronizacja jest kluczowa dla utrzymania homeostazy. Rytm okołodobowy wpływa m. in. na powstawanie, aktywację, migrację i funkcję komórek układu odpornościowego. Zakłócenia synchronizacji okołodobowej mogą prowadzić do zaburzeń funkcji układu odpornościowego [7]. Glukokortykoidom, jako jednym z pierwszych hormonów, przypisano udział w regulacji cyklu dobowego i opisano ich charakterystyczną syntezę w rytmie dobowym [8, 9]. Synteza glukokortykoidów znajduje się pod kontrolą osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej – HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal

axis). Aktywność układu odpornościowego podlega regulacji neuroendokrynowej, w której najlepiej opisaną rolę odgrywa oś HPA. Ponadto, układ odpornościowy wykazuje dymorfizm płciowy, za który odpowiada oś podwzgórzowo – przysadkowo – gonadowa – HPG (hypothalamic–pituitary–gonadal) [10].

2.1 Limfocyty T regulatorowe

Wyniki badań eksperymentalnych z wykorzystaniem zwierząt i komórek odpornościowych człowieka wykazały, że regulatorowe limfocyty T pełnią bardzo ważną rolę w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego. Biorą udział w utrzymaniu tolerancji immunologicznej na antygeny własne i hamowaniu nadmiernej odpowiedzi na antygeny obce [11]. Limfocyty T regulatorowe mogą zapobiegać rozwojowi lub hamować objawy kliniczne chorób autoimmunizacyjnych, alergii oraz innych typów nadwrażliwości [12, 13]. Uczestniczą w utrzymaniu tolerancji na antygeny płodu, przeszczepionych tkanek oraz zapobiegają reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi [14, 15]. Brak limfocytów Treg skutkuje rozwojem chorób autoimmunizacyjnych. Natomiast nadmierna aktywność supresorowa limfocytów Treg ułatwia rozwój nowotworów, hamuje odpowiedź na infekcje patogenami oraz zmniejsza skuteczność szczepionek [16-18].

Wraz z rozwojem metodyki badawczej w ostatnich latach opisano kilka typów limfocytów o właściwościach supresorowych zarówno u myszy jak i u ludzi [19]. Rozróżnia się je na podstawie ekspresji określonych markerów powierzchniowych i poznanych bądź hipotetycznych mechanizmów działania: CD4+CD25+, Tr1, Th3, CD4+CD25-, CD8+CD28-, limfocyty NKT, limfocyty T $\gamma\delta$ (**Tabela 1**) [20-22]. Najczęściej badanymi limfocytami T regulatorowymi są limfocyty Treg CD4+CD25+, wśród których wyróżniono naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg) powstające w grasicy oraz indukowane regulatorowe limfocyty T (iTreg) powstające w obwodowych narządach limfoidalnych pod wpływem aktywacji antygenowej [23]. Zarówno limfocyty nTreg jak i iTreg charakteryzują się ekspresją czynnika transkrypcyjnego Foxp3, który odpowiada za ich funkcje supresorowe. Często limfocyty Treg o fenotypie CD4+CD25+Foxp3+ niezależnie od miejsca występowania i pochodzenia określane są terminem nTreg.

Typ Treg	Funkcja	Mechanizm działania
Th3	supresja proliferacji limfocytów Th1 i Th2; tolerancja pokarmowa	TGF- β
Tr1	supresja proliferacji i produkcji cytokin przez naiwne limfocyty CD4+CD25-, Th1, Th2	IL-10 i TGF- β
CD4+CD25+	supresja proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty CD4+CD25-; utrzymanie homeostazy; ochrona przed autoimmunizacją i nadwrażliwością	kontakt komórka-komórka; IL-10 i TGF- β
CD8+CD28-	wyciszanie odpowiedzi immunologicznej (modulacja komórek dendrytycznych); uczestniczenie w rozwoju tolerancji transplantacyjnej	interakcja z ligandem na komórkach dendrytycznych; IL-10 i TGF- β
NKT (CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +)	tolerancja obwodowa; działanie cytotoksyczne (przeciwnowotworowe)	IL-4, IFN- γ , TGF- β
T $\gamma\delta$	supresja przeciwnowotworowa i przeciwwakaźna	IL-10 i TGF- β

Tabela 1. Typy limfocytów T regulatorowych (według [20-22, 24])

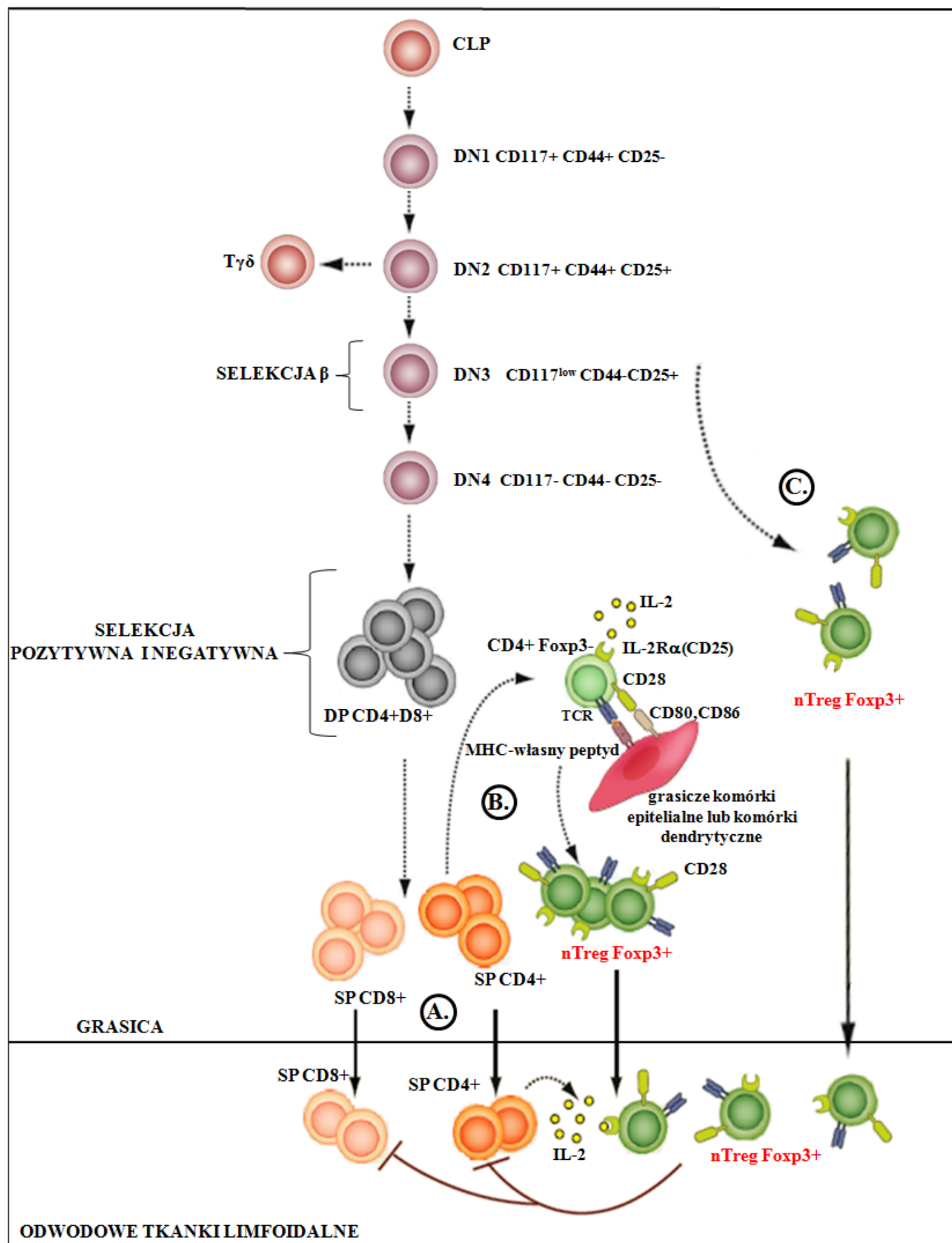
2.2 Powstawanie naturalnych regulatorowych limfocytów T

Grasica jest centralnym narządem limfoidalnym, w którym powstaje wielozadaniowa populacja limfocytów T zdolna do wykonywania konwencjonalnych funkcji efektorowych oraz funkcji supresorowej w czasie odpowiedzi immunologicznej. W grasicy dojrzewające i różnicujące limfocyty T nazywane są tymocytami od nazwy grasicy (łac. „*thymus*”). Tymocyty wywodzą się z komórek progenitorowych szpiku kostnego (CLP, common lymphoid progenitors), które zasiedlają grasicę i podlegają dalszemu rozwojowi (**Ryc. 1**). Komórki te, po zasiedleniu grasicy przechodzą przez kolejne stadia rozwojowe charakteryzowane na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych CD4 i CD8. Począwszy od najmniej dojrzałych tymocytów podwójnie – negatywnych (double negative) DN CD4-CD8- nie posiadających powierzchniowych białek koreceptorowych CD4 i CD8, poprzez tymocyty podwójnie – pozytywne (double positive) DP CD4+CD8+ wykazujące ekspresję obu koreceptorów CD4 i CD8, aż do dojrzałych tymocytów pojedynczo – pozytywnych (single positive) SP CD4+ i SP CD8+. Wśród tymocytów DN wyróżniono cztery stadia rozwojowe na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych takich, jak receptor dla czynnika wzrostowego komórek macierzystych

– c-kit/CD117, receptor kwasu hialuronowego – CD44 i łańcucha α receptora dla IL-2 – CD25: CD117+CD44+CD25- (DN1), CD117+CD44+CD25+ (DN2), CD117^{low}CD44-CD25+ (DN3) oraz CD117-CD44-CD25- (DN4) [25, 26]. Tymocyty DN1 to intensywnie proliferująca populacja komórek. Za rozwój tymocytów DN1 w kierunku limfocytów T odpowiada białko receptorowe Notch, które występuje w ich błonie i oddziałuje z ligandami prezentowanymi przez komórki zrębu grasicy [27]. Dalsze dojrzewanie tymocytów DN1 przebiega podczas ich migracji w głąb kory grasicy. Na etapie tymocytów DN1 i DN2 następuje rozdzielenie linii rozwojowych limfocytów T- $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ o odrębnej strukturze receptora dla antygeny, jak również możliwe jest ich różnicowanie do komórek NK, komórek dendrytycznych a nawet do makrofagów [27-30]. Bardzo ważne dla przeżycia tymocytów na tym etapie są cytokiny o charakterze czynników wzrostowych, takie jak interleukina-7 (IL-7) czy czynnik wzrostowy komórek macierzystych (SCF), działające poprzez specyficzne receptory powierzchniowe, odpowiednio CD127 i CD117 [31]. W stadium DN2 zaczyna się również rearanżacja genów kodujących łańcuchy δ i γ dla receptora limfocytów T (TCR). Dalszy etap rearanżacji genów TCR zachodzi w stadium DN3. Na tym etapie rozwoju dochodzi do rearanżacji łańcucha β TCR, który łączy się kowalencyjnie z zastępczym łańcuchem α i razem z podjednostkami CD3 tworzy kompleks pre-TCR. Aktywacja TCR $\alpha\beta$ dostarcza sygnały chroniące tymocyty DN3 przed apoptozą. Komórki niezdolne do prawidłowej rearanżacji TCR β ulegają apoptozie. Proces ten jest pierwszym punktem kontrolnym różnicowania tymocytów zwany β -selekcją. Sygnał przekazywany przez pre-TCR powoduje również zahamowanie ekspresji CD25, indukcję ekspresji CD4 i CD8 oraz intensywną proliferację tymocytów w stadium DN4. Na tym etapie wyodrębnia się populacja DP CD4+CD8+, która jest najliczniejszą populacją w grasicy stanowiącą 75-88% wszystkich tymocytów. W stadium DP dochodzi do ostatecznej rearanżacji genów TCR $\alpha\beta$. Populacja tymocytów DP CD4+CD8+ przemieszcza się w stronę rdzenia grasicy i przechodzi przez kolejne punkty kontrolne różnicowania tymocytów zwane selekcją negatywną i pozytywną. Proces selekcji jest wielostopniowy i zapobiega dojrzewaniu tymocytów wykazujących ekspresję receptorów TCR niezdolnych do rozpoznawania kompleksów MHC/własny peptyd lub wykazujących zbyt duże powinowactwo do tych kompleksów. Tymocyty wykazujące ekspresję niefunkcjonalnego TCR nie wiążą kompleksu MHC/peptyd i ulegają apoptozie określanej mianem „śmierci przez zaniedbanie”. Tymocyty posiadające TCR o zbyt silnym powinowactwie do MHC/peptyd ulegają apoptozie w procesie *selekcji negatywnej*.

Tymocyty o prawidłowym powinowactwie TCR do kompleksu MHC/własny peptyd podlegają selekcji pozytywnej [32, 33]. Proces selekcji negatywnej i pozytywnej zależy od sygnału przekazywanego przez TCR oraz sygnału pochodzącego od receptora dla glukokortykoidów (GCR) [34, 35]. Tymocyty, które pozytywnie przeszły etap selekcji pozytywnej i negatywnej podlegają dalszemu rozwojowi w dojrzałe tymocyty SP CD4⁺ i CD8⁺ (**Ryc. 1A**), określane także terminem „konwencjonalnych”, które następnie migrują do obwodowych narządów limfoidalnych [36]. W grasicy powstają również naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg) o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Foxp3 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ich rozwój i funkcje supresorowe [37, 38]. W przeciwieństwie do konwencjonalnych limfocytów T, rozwój nTreg jest słabo poznany i pozostaje nadal obiektem intensywnych badań. Według Itoh, Sakaguchi i wsp. tymocyty nTreg mogą powstawać na późnym etapie rozwoju tymocytów SP CD4⁺ (**Ryc. 1B**). Badacze ci zaobserwowali, że usunięcie limfocytów T CD4⁺CD25⁺ wywołuje rozwój choroby autoimmunizacyjnej [39]. Według innego modelu rozwoju nTreg zwanego „modelem koniecznej awidności” (*strict-affinity model*) przyjmuje się, że nTreg wywodzą się z linii tymocytów charakteryzującej się bardzo dużym powinowactwem TCR do kompleksu MHC/własny peptyd. Przekazywanie sygnału od receptorów TCR o dużej awidności warunkuje rozpoczęcie programu transkrypcyjnego, który odpowiada za różnicowanie niedojrzałego tymocytu w dojrzały tymocyt nTreg [40]. Badania fosforylacji łańcucha ζ TCR potwierdzają tę hipotezę. Fosforylacja może być markerem siły przekazywanego sygnału od TCR. Wykazano, że tymocyty CD4⁺CD25⁺ wykazują dwa razy większy poziom fosforylacji łańcucha ζ niż tymocyty CD4⁺CD25⁻. Wskazuje to, że tymocyty CD4⁺CD25⁺ otrzymują silniejszy sygnał od TCR niż tymocyty CD4⁺CD25⁻ [18]. Zasadę wyboru tymocytów ukierunkowanych do rozwoju w nTreg opisuje „hipoteza ograniczonej niszy” (*limiting niche hypothesis*). Do rozwoju nTreg potrzebne są dwa sygnały: jeden od receptorów TCR o silnej awidności, a drugi od czynnika obecnego w grasicy w ograniczonej ilości. Szereg badań wskazuje, że takimi czynnikami mogą być IL-2 czy ligandy dla cząsteczki CD28, czyli CD80/CD86. Konwersja tymocytów, posiadających średnią awidność receptorów TCR dla antygeny, w nTreg nie jest ograniczana przez IL-2 i cząsteczki CD80/CD86. Natomiast do konwersji tymocytów, posiadających dużą awidność receptorów TCR w nTreg potrzebna jest obecność IL-2 i cząsteczki CD80/CD86. Interakcja CD28-CD80/CD86 promuje przeżywalność nTreg prawdopodobnie poprzez wpływ na produkcję IL-2 i indukcję białek

antyapoptotycznych Bcl-2. Kostymulacja za pośrednictwem CD28 jest niezbędna do rozwoju nTreg w grasicy i utrzymania ich stabilnej puli w obwodowych narządach limfoidalnych. Nie wiadomo czy sygnały te muszą być dostarczone jednocześnie, są jednak niezbędne do indukcji ekspresji czynnika Foxp3 [40]. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na odrębny szlak rozwojowy nTreg. Wskazują na prawdopodobieństwo powstawania nTreg w stadium tymocytów DN CD4-CD8- (**Ryc. 1C**), w którym rearanżacja genów kodujących TCR nie jest kompletna [41]. Oznacza to, że selekcja nTreg przynajmniej częściowo może być niezależna od sygnału TCR [42]. Inne wyniki badań, porównujące repertuar TCR sugerują, że używany przez limfocyty nTreg i konwencjonalne limfocyty T receptor TCR są w dużej mierze podobne. W badaniach *in vitro* zaobserwowano również, że komórki hybrydowe naiwnych limfocytów T CD4+ wykazujące ekspresję TCR limfocytów Treg były niewrażliwe na stymulację autologicznymi komórkami prezentującymi antygen-APC (pochodzące ze śledziony) prezentującymi kompleksy MHC-własny peptyd i nie produkowały IL-2. Co ciekawe, większość z tych komórek hybrydowych ulegała aktywacji przez obce białka prezentowane w kontekście MHC. Ponadto, częstość rozpoznania obcych białek przez TCR limfocytów Treg czy TCR naiwnych limfocytów T CD4+ była podobna. Tak więc brakuje zgodności w kontekście znaczenia specyficzności i roli receptora TCR w różnicowaniu nTreg [42, 43]. Inne jeszcze wyniki badań wskazują, że ekspresja czynnika Foxp3 może zachodzić już na bardzo wczesnym etapie rozwojowym, w tymocytach DN. Wyniki badań z wykorzystaniem posiadających pod promotorem genu *Foxp3* – gen reporterowy *GFP* wykazały wysoki odsetek komórek Foxp3+ w stadium rozwojowym tymocytów SP CD4+, niższy w tymocytach DP CD4+CD8+ i SP CD+8 oraz najniższy w tymocytach DN CD4-CD8- [44]. Ponadto wyniki badań z wykorzystaniem tymocytów człowieka wskazują na obecność Foxp3 na poziomie niedojrzałych tymocytów DN [45]. Zatem szlak rozwojowy limfocytów nTreg pozostaje nadal niewyjaśniony i wymaga dalszych badań.



Ryc. 1 Rozwój limfocytów nTreg (według [23])

Komórki CLP w grasicy przechodzą kolejne stadia rozwojowe, które charakteryzowane są na podstawie ekspresji specyficznych markerów powierzchniowych CD4 i CD8: począwszy od najmniej dojrzałych DN CD4-CD8- (DN1, DN2, DN3, DN4) nie posiadających na swej powierzchni białek koreceptorowych CD4 i CD8, poprzez tymocyty DP CD4+CD8+ wykazujące ekspresję obu koreceptorów CD4 i CD8, aż do osiągnięcia dojrzałości przez tymocyty SP CD4+ i SP CD8+, zwane konwencjonalnymi (A). Prawdopodobny szlak rozwoju nTreg: tymocyty nTreg mogą powstawać w późnym stadium rozwoju tymocytów SP CD4+ (B). Kolejny przypuszczalny szlak rozwoju nTreg: tymocyty nTreg mogą powstawać w stadium tymocytów DN (C). **CLP** – komórki progenitorowe szpiku kostnego; **DN** (double negative) podwójnie – negatywne tymocyty; **DP** (double positive) podwójnie – pozytywne tymocyty; **SP** (single positive) pojedynczo pozytywne tymocyty.

2.3 Charakterystyka fenotypowa naturalnych regulatorowych limfocytów T

Podjęto wiele badań nad ustaleniem charakterystycznych markerów limfocytów nTreg ulegających ekspresji powierzchniowej i wewnątrzkomórkowej. Liczba swoistych markerów przypisywanych tym komórkom stale zwiększa się. Opisano również różnice w ekspresji znanych markerów między limfocytami nTreg myszy i człowieka (**Tabela 2**) [46]. Najwcześniej zidentyfikowanym markerem zarówno mysich jak i ludzkich limfocytów nTreg jest powierzchniowa ekspresja cząsteczki CD25 [3]. Innymi ważnymi markerami ulegającymi powierzchniowej ekspresji są na mysich nTreg – LAG-3 oraz na ludzkich limfocytach nTreg – GITR. Ważne w indukcji aktywności supresorowej limfocytów Treg są markery wewnątrzkomórkowe, Foxp3 i CTLA-4 występujące u obu gatunków. Jednym z niedawno odkrytych markerów charakterystycznych dla mysich i ludzkich limfocytów T regulatorowych jest czynnik transkrypcyjny Helios. Wyniki badań wskazują, że mutacja w genie *helios* uniemożliwia wiązanie sekwencji DNA, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju chorób nowotworowych układu krwionośnego – białaczki, zarówno u myszy [47] i ludzi [48] [49]. Wymienione markery charakterystyczne są dla limfocytów T regulatorowych powstających zarówno w grasicy jak i pozagrasicy, co jak już wcześniej wspomniano, utrudnia odróżnienie limfocytów nTreg od iTreg powstających pod wpływem aktywacji antygenami w obwodowych narządach limfoidalnych [38, 50-52].

	Mysz	Człowiek
Markery powierzchniowe	CD11b/CD18 ^{high} , CD25 ^{intmediate-high} , CD30, 45RB ^{low} , CD5 ^{high} , CD69, CD150 ^{low} , TNFR11, OX40, 4-1BB, TRANCE, CD103(aE), CCR2, CCR6, CCR7, CXCR3, LAG-3, Nrpl, PD-1, TLR4, TLR7, galektyna-1, Ly6A/E ^{high} , TGFβR1,	CD25 ^{high} , CD27, CD45RO ^{high} , CD58, CD83, CD95 ^{high} , HLA-DR ^{low} , a4β1, a4β7, CCR4, CCR8, Granzym A
	CD122 ^{high} , CD132, CD28, CD38 ^{high} , CD44 ^{high} , CD62L, CD54, CD71, CD127, GITR, TLR5, TLR8, TGF-β, CTLA-4	
Markery wewnątrzkomórkowe	CTLA-4, Foxp3	

Tabela 2. Markery limfocytów nTreg myszy i człowieka (według [46])

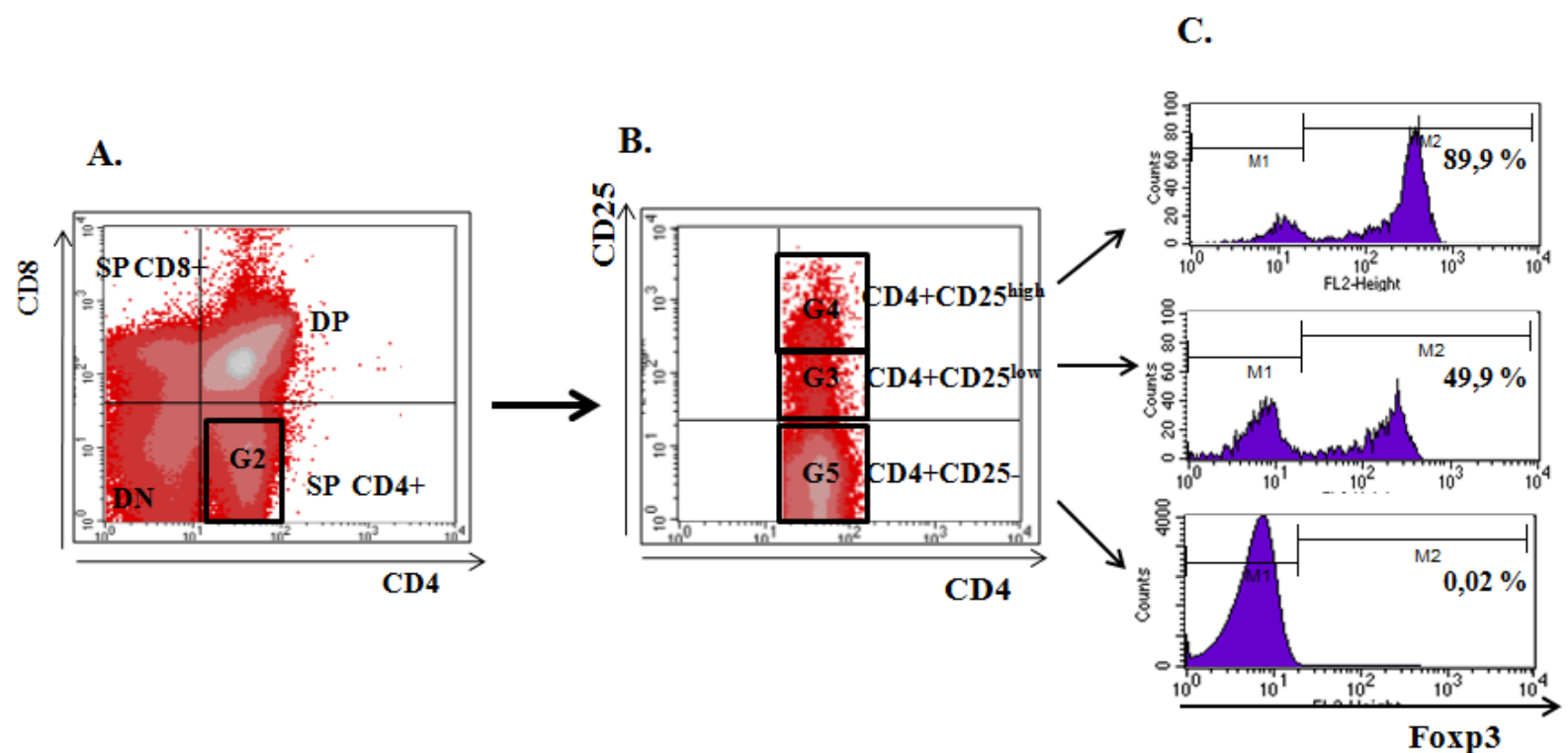
Markery powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe limfocytów nTreg myszy i człowieka. Na szarym polu oznaczono markery specyficzne tylko dla nTreg człowieka lub myszy. Na białym polu oznaczono markery wspólne dla nTreg obu gatunków.

Ostatnie badania wykazały, że nTreg myszy wykazują ekspresję Neuropiliny-1 pełniącą funkcję koreceptora. Jest to białko transbłonowe niezbędne w przewodnictwie nerwowym, regulacji angiogenezy i aktywacji limfocytów T [53]. Według najnowszych doniesień Neuropilina-1 (Nrpl) może być markerem umożliwiającym rozróżnienie limfocytów nTreg od iTreg. Wyniki wskazują, że ekspresja Nrpl różni się na obu populacjach Treg. Poziom ekspresji Nrpl na limfocytach nTreg jest duży, a w przypadku iTreg – mały. Zaobserwowano również, że limfocyty nTreg Nrpl^{high} i iTreg Nrpl^{low} wykazują podobne funkcje supresorowe. Identyfikacja nowego markera może umożliwić dalszy rozwój badań nad rolą nTreg i iTreg w układzie odpornościowym [54, 55].

2.3.1 CD25 – podjednostka α receptora dla interleukiny 2

Naturalne regulatorowe limfocyty T wykazują wysoką, konstytutywną ekspresję podjednostki α receptora dla IL-2, CD25. Powierzchniowa ekspresja CD25 na konwencjonalnych limfocytach T SP CD4⁺ jest indukowana w wyniku aktywacji przez antygen i jest przejściowa. IL-2 jest niezbędna do rozwoju, proliferacji i utrzymania homeostazy limfocytów nTreg w obwodowych narządach limfoidalnych. Transdukcja sygnału od receptora dla IL-2 (IL-2R) wymagana jest do aktywacji funkcji supresorowych naturalnych regulatorowych limfocytów T. Aktywowane limfocyty nTreg nie produkują IL-2. Konstytutywna ekspresja CD25 powoduje, że skutecznie konkurują o IL-2 wydzielane przez inne komórki w środowisku [56, 57]. U myszy nie syntetyzujących IL-2 lub posiadających uszkodzony gen receptora IL-2 (CD25) występuje zredukowana liczba limfocytów regulatorowych T zarówno w grasicy jak i w obwodowych narządach limfoidalnych oraz wzrost proliferacji i liczby konwencjonalnych limfocytów T CD4⁺ [58, 59].

Wśród tymocytów SP CD4⁺ wyróżnia się na podstawie ekspresji CD25 dwie odrębne populacje, CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high}, uznawane za kolejne stadia rozwojowe limfocytów nTreg (**Ryc. 2**). W populacji CD4⁺CD25^{high}, odsetek tymocytów wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i posiadających w pełni supresorowy fenotyp waha się w zakresie 90-100%. Na podstawie wysokiej ekspresji CD25 można identyfikować populację funkcjonalnie dojrzałych limfocytów nTreg [60, 61].



Ryc. 2 Schemat analizy tymocytów $CD4+CD25^{low}$ i $CD4+CD25^{high}$

A – rozkład głównych populacji tymocytów, bramka G2 zawiera tymocyty SP $CD4+$; **B** – rozkład tymocytów $CD4+CD25^{low}$ (bramka G3) i $CD4+CD25^{high}$ (bramka G4) oraz $CD4+CD25^{-}$ (bramka G5); **C** – reprezentatywne histogramy przedstawiające zawartość procentową tymocytów Foxp3+ (przedział M2) w populacji $CD4+CD25^{-}$, $CD4+CD25^{low}$ i $CD4+CD25^{high}$. **M1/M2** przedziały analizy: **M1** – tymocyty Foxp3-negatywne; **M2** – tymocyty Foxp3-pozytywne (Foxp3+)

2.3.2 Czynniki transkrypcyjny Foxp3

Czynnik transkrypcyjny Foxp3 uważany jest za najbardziej specyficzny marker limfocytów nTreg. Jest markerem ich dojrzewania i jest niezbędny w pełnieniu funkcji supresorowej [11, 38, 44]. Charakterystyczna dla limfocytów T regulatorowych ekspresja Foxp3 zachodzi na wysokim poziomie zarówno genu jak i białka [62]. Transfekcja naiwnych limfocytów T $CD4+$ genem *foxp3* przyczynia się do ich anergii oraz indukowania fenotypu i funkcji podobnych do tych jakie pełnią naturalne regulatorowe limfocyty T [37].

Foxp3 należy do czynników transkrypcyjnych z rodziny *forkhead/winged-helix*. Gen *foxp3* zlokalizowany jest w chromosomie Xp.11.23 i koduje białko skurfinę (SFN). Po raz pierwszy Foxp3 zidentyfikowano w 2001 roku u myszy *sf* (*scurfy*) z pojedynczą mutacją genu Foxp3 w chromosomie X. U tych myszy rozwijały się choroby autoimmunizacyjne [63, 64]. Mutacje w genie *foxp3* człowieka, mysim ortologu Foxp3, prowadzą do rozwoju ciężkich chorób autoimmunizacyjnych zwanych zespołem IPEX (sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii, enteropatii) [65, 66]. Do podobnych skutków, jak w przypadku mutacji czy delecji genu *foxp3*, dochodzi po usunięciu populacji regulatorowych limfocytów T [67]. U myszy tymektomia

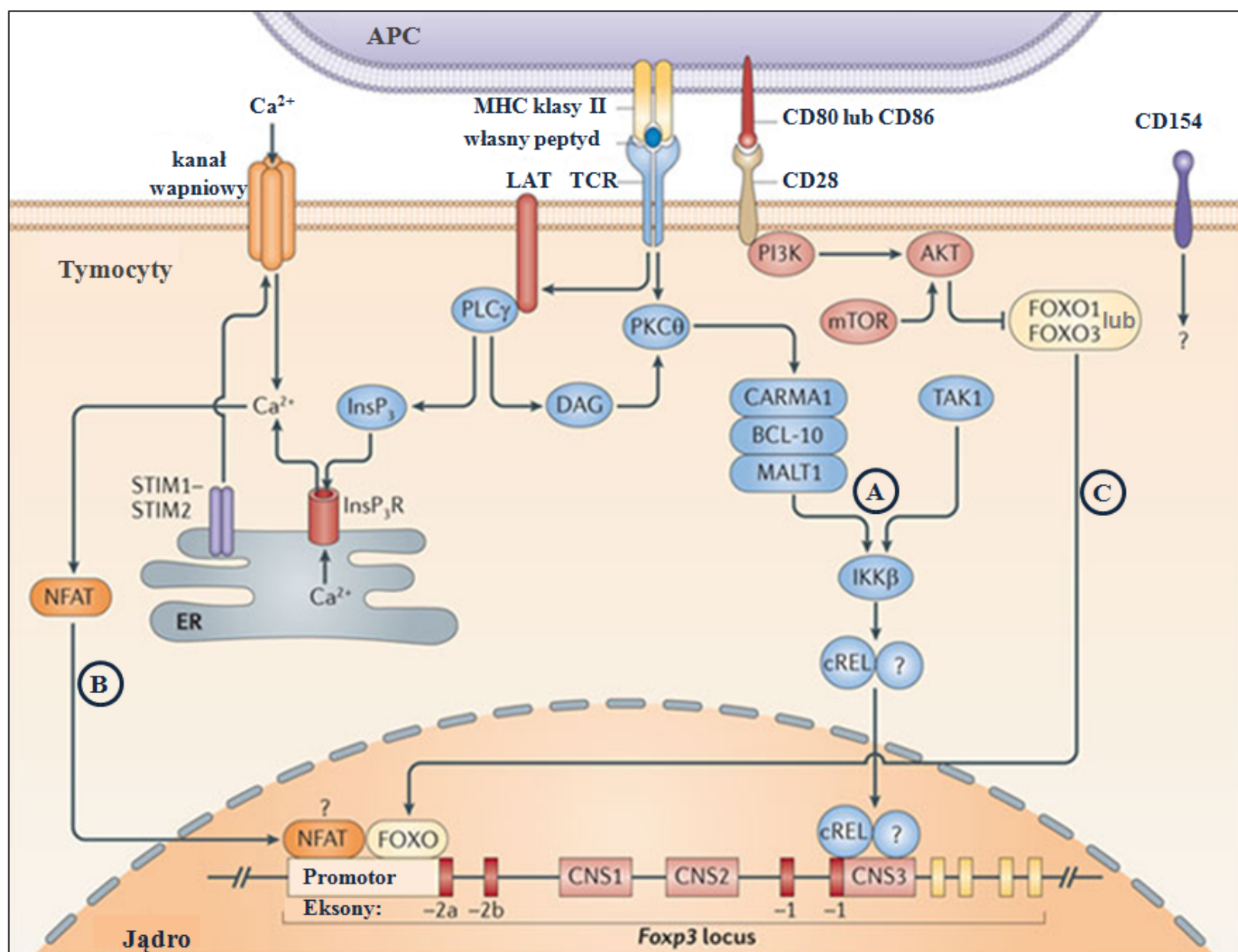
w trzecim dniu po urodzeniu skutkuje rozwojem chorób autoimmunizacyjnych [68]. Transfer funkcjonalnych limfocytów Treg z myszy szczepu dzikiego do myszy *sf* (*scurfy*) zapobiega ich śmierci wynikającej z chorób limfoproliferacyjnych [67]. Ponadto wyniki badań wskazują, że nie tylko całkowity brak ekspresji Foxp3, ale również zmniejszona ekspresja Foxp3 może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych, jak to zaobserwowano u myszy szczepu FILIG charakteryzujących się zmniejszoną ekspresją genu *foxp3* [69]. Zatem, prawidłowe funkcjonowanie limfocytów Treg zależy od odpowiedniego poziomu ekspresji Foxp3, a zmniejszenie jego ekspresji ułatwia rozwój chorób o podłożu zapalnym czy autoimmunizacyjnym [70, 71].

Czynniki, indukujące ekspresję Foxp3 a tym samym różnicowanie limfocytów nTreg są ciągle badane. Wskazuje się na rolę interakcji TCR-CD28 w transdukcji sygnału, który może wpływać na indukcję syntezy czynnika Foxp3. Aktywacja komórki poprzez receptor TCR powoduje indukcję wielu czynników transkrypcyjnych jak AKT, mTOR, NFAT i NF- κ B. Wydaje się, że jony Ca^{2+} mogą odgrywać rolę w rozwoju nTreg, chociaż rola czynnika transkrypcyjnego NFAT – aktywowanego jonami Ca^{2+} – nie została jeszcze wyczerpująco opisana [72, 73]. Natomiast aktywacja szlaku sygnałowego AKT-mTOR powoduje zahamowanie różnicowania nTreg [74-76]. Prawdopodobnie jest to wywołane zahamowaniem syntezy czynnika transkrypcyjnego FOXO wymaganego w powstawaniu nTreg. Czynniki FOXO kontroluje ekspresję Foxp3 i innych genów związanych z różnicowaniem limfocytów Treg. U myszy z delecją *Foxo1* i *Foxo3* zaobserwowano rozwój chorób autoimmunizacyjnych [77-79]. Nie wiadomo czy szlak sygnałowy AKT-mTOR może podlegać jakiejś regulacji, która mogłaby powodować efektywniejsze powstawanie nTreg w grasicy niż iTreg w obwodowych narządach limfoidalnych [80]. Nie jest także jasne, czy na poziomie AKT-mTOR nie ma dynamicznych zmian, które mogą zależeć od siły interakcji receptora TCR z antygenem lub poziomu aktywacji komórek prezentujących antygen [42].

Wśród licznych szlaków sygnałowych biorących udział w różnicowaniu nTreg w grasicy, najbardziej znanym i jednym z ważniejszych jest szlak związany z aktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (**Ryc. 3**) [81-83]. U myszy z mutacjami genów kodujących elementy szlaku sygnałowego NF- κ B, takich jak kinaza białkowa C θ (PKC θ), CARMA1, Bcl-10, TAK1 i IKK β zaobserwowano zmniejszenie odsetka nTreg, co wskazuje na istotną rolę NF- κ B w ich różnicowaniu [42, 81]. Jednym z czynników transkrypcyjnych z rodziny NF- κ B odpowiedzialnym za indukcję ekspresji Foxp3 jest cREL [81-83]. Nie jest jednak

jasne czy cREL działa jako homodimer czy tworzy pary z innymi czynnikami z rodziny NF- κ B. Wiadomo natomiast, że wiąże region CNS3 w *locus* Foxp3 i uaktywnia jego ekspresję [83].

Czynnik transkrypcyjny Foxp3 może działać zarówno jako aktywator jak i represor [84]. Badania wskazują, iż Foxp3 wiąże się w sposób bezpośredni z regionami promotorowymi genów i reguluje ich transkrypcję [85]. Wykazano, że ulegający ektopowej ekspresji Foxp3 jest zdolny do wiązania z promotorami genów CD25, CTLA-4 i GITR powodując aktywację ich transkrypcji, wzrost ekspresji cząsteczek związanych z regulatorowymi limfocytami T i wzmocnienie aktywności supresorowej. Wyniki innych badań wskazują, że Foxp3 może także negatywnie regulować geny np. kodujące łańcuch α receptora dla IL-7 (CD127) czy geny cytokin takich jak IL-2, IL-4 i IFN- γ [70, 86, 87].



Ryc. 3 Szlaki sygnałowe w regulacji ekspresji Foxp3 (według [42])

Wiązanie przez TCR kompleksu MHCII/własny peptyd wywołuje aktywację różnych szlaków sygnałowych. Główny mechanizm indukujący syntezę czynnika Foxp3 przebiega przez szlak sygnałowy NF- κ B, w którym bierze udział kompleks CARMA1 – BCL-10 – MALT1. Kinaza- β I κ B (IKK β) aktywowana przez kompleks CARMA1 – BCL-10 – MALT1 oraz kinazę TAK1 fosforyluje inhibitor (I κ B) czynnika NF- κ B, co powoduje dysocjację I κ B od NF- κ B i w

konsekwencji degradację inhibitora. Uwolniony czynnik transkrypcyjny cREL z rodziny NF- κ B ulega translokacji do jądra komórkowego i wiąże region CNS3 w *locus* Foxp3 (A). Mniej poznany szlak sygnałowy NFAT ulegający aktywacji pod wpływem jonów Ca^{2+} również indukuje ekspresję Foxp3 (B). Szlak sygnałowy AKT-mTOR negatywnie reguluje czynnik Foxp3 poprzez fosforylację i inhibicję czynnika transkrypcyjnego FOXO pozytywnie regulującego ekspresję Foxp3 (C). APC – komórka prezentująca antygen; CARMA 1 (CARD-containing MAGUK protein 1) -białko CARMA 1; Bcl-10 (B cell lymphoma 10) - białko BCL-10; MALT1 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) - parakaspa MALT 1; mTOR (mammalian target of rapamycin) – kinaza mTOR; TAK 1 (TGF β -activated kinase 1) – kinaza TAK 1; DAG – diacyloglicerol; ER – retikulum endoplazmatyczne; InsP₃-trifosforan-1,4,5 inozytolu; LAT – białko adaptorowe; PI3K – kinaza-3 fosfatydyloinozytolu; PKC θ - kinaza białkowa C; PLC γ – fosfolipaza C; STIM1/2 (stromal interaction molecule) - sensory jonów Ca^{2+} wewnątrz ER; NFAT (nuclear factor of activated T cells) - czynnik transkrypcyjny NFAT; FOXO (forkhead box O) – czynnik transkrypcyjny FOXO.

2.4 Mechanizmy supresji z udziałem nTreg

Naturalne regulatorowe limfocyty T migrują do obwodowych narządów limfoidalnych jako funkcjonalnie dojrzała populacja o właściwościach supresorowych stanowiąc 5-10% obwodowych limfocytów T CD4⁺ u myszy i u ludzi [3, 61, 88]. Pierwotną i najlepiej opisaną funkcją nTreg jest zdolność do hamowania proliferacji i produkcji cytokin przez efektorowe limfocyty CD4⁺CD25⁻, supresyjnego działania wobec limfocytów T CD8⁺, monocytów, komórek NK i komórek dendrytycznych, a także hamowania aktywności limfocytów B poprzez hamowanie syntezy przeciwciał i indukcję apoptozy [89-93]. Mechanizmy działania naturalnych regulatorowych limfocytów T są nadal badane. Jak dotąd uważa się, że limfocyty nTreg pełnią funkcję supresyjną głównie w bezpośrednim kontakcie z komórką docelową. Nie wyklucza się jednak udziału w tym procesie cytokin lub innych białek. Choć niektóre wyniki badań pod tym względem są sprzeczne, przyjmuje się, że nTreg mogą działać w sposób zależny i niezależny od cytokin [84, 89, 94]. Opisane dotychczas mechanizmy supresji limfocytów nTreg obejmują supresję: za pośrednictwem cytokin, z udziałem komórek dendrytycznych, cytotoksyczność oraz zaburzenia metaboliczne w indukcji supresji.

2.4.1 Cytokiny w aktywności supresorowej limfocytów nTreg

Limfocyty nTreg produkują cytokiny IL-10, IL-35 i TGF- β , które pośredniczą w supresji (Ryc. 4A). Interleukina – 10 hamuje wytwarzanie cytokin przez efektorowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ oraz aktywowane makrofagi. Zmniejsza ekspresję cząsteczek

MHC klasy II, ICAM-1 i B7 (CD80/CD86) na komórkach prezentujących antygen. Większość wyników badań wskazuje na udział IL-10 w mechanizmach supresji nTreg. U myszy niezdolnych do wytwarzania IL-10 [95] lub jej wiązania [96] przez receptory błonowe (po podaniu przeciwciał przeciw receptorowi IL-10) zaobserwowano ostre odrzucanie przeszczepu wynikające z nieefektywnego działania limfocytów nTreg. Znane są jednak wyniki badań podważające udział IL-10 w tolerancji transplantacyjnej [97]. Podobnie jak w przypadku IL-10, opinie badaczy na temat udziału TGF- β w supresji limfocytów nTreg są podzielone [97-99]. TGF- β w przeciwieństwie do IL-10 może występować w dwóch formach: błonowej i rozpuszczalnej [91, 100]. Prawdopodobnie błonowa postać TGF- β uczestniczy w przekazywaniu hamującego sygnału w czasie bezpośredniego kontaktu limfocytów nTreg z komórkami docelowymi [101]. Supresorowe działanie TGF- β skierowane jest wobec aktywowanych makrofagów, limfocytów T i B oraz komórek NK. Podobnie jak IL-10 hamuje ekspresję cząsteczek MHC-klasy II na komórkach prezentujących antygen. Działanie TGF- β zależy od stężenia IL-2: w środowisku dużego stężenia IL-2 działa stymulująco powodując wzrost ekspresji cząsteczek CD25, CD122 i CTLA-4 na naiwnych limfocytach T CD4⁺ powodując ich aktywację i różnicowanie w limfocyty iTreg [102].

Stosunkowo niedawno odkryta cytokina IL-35 należy do rodziny cytokin IL-12. Interleukina 35 wydzielana jest tylko przez limfocyty nTreg i bierze udział w ich funkcji supresorowej. Zaobserwowano, że ektopowa ekspresja IL-35 aktywuje funkcje regulatorowe w naiwnych limfocytach T a powstające rekombinanty IL-35 hamują proliferację efektorowych limfocytów T *in vitro*. Nie wiadomo czy IL-35 hamuje rozwój i funkcje innych komórek układu odpornościowego takich jak komórki dendrytyczne czy makrofagi. Mechanizm działania nowo odkrytej cytokiny wymaga dalszych badań [103, 104].

2.4.2 Cytotoksyczność

Dotychczas, funkcję cytotoksyczną przypisywano głównie komórkom NK oraz cytotoksycznym limfocytom T CD8⁺ [105]. Stwierdzono, że aktywność cytotoksyczną wykazują również ludzkie i mysie naturalne regulatorowe limfocyty T (**Ryc. 4B**). Zaobserwowano, że ludzkie nTreg indukują apoptozę komórek docelowych z udziałem granzymu A i perforyn [106]. U myszy wykryto ekspresję granzymu B, który może działać zależnie i niezależnie od perforyn powodując apoptozę efektorowych limfocytów T [107-

109]. Wyniki nowszych badań wskazują, że w mechanizmie cytotoksyczności mogą również uczestniczyć TRAIL-DR5 [110] i galektyna-1, które prowadzą do apoptozy limfocytów T [111]. Poznanie mechanizmów cytotoksyczności wykorzystywanych przez limfocyty nTreg wymaga jeszcze dalszych badań.

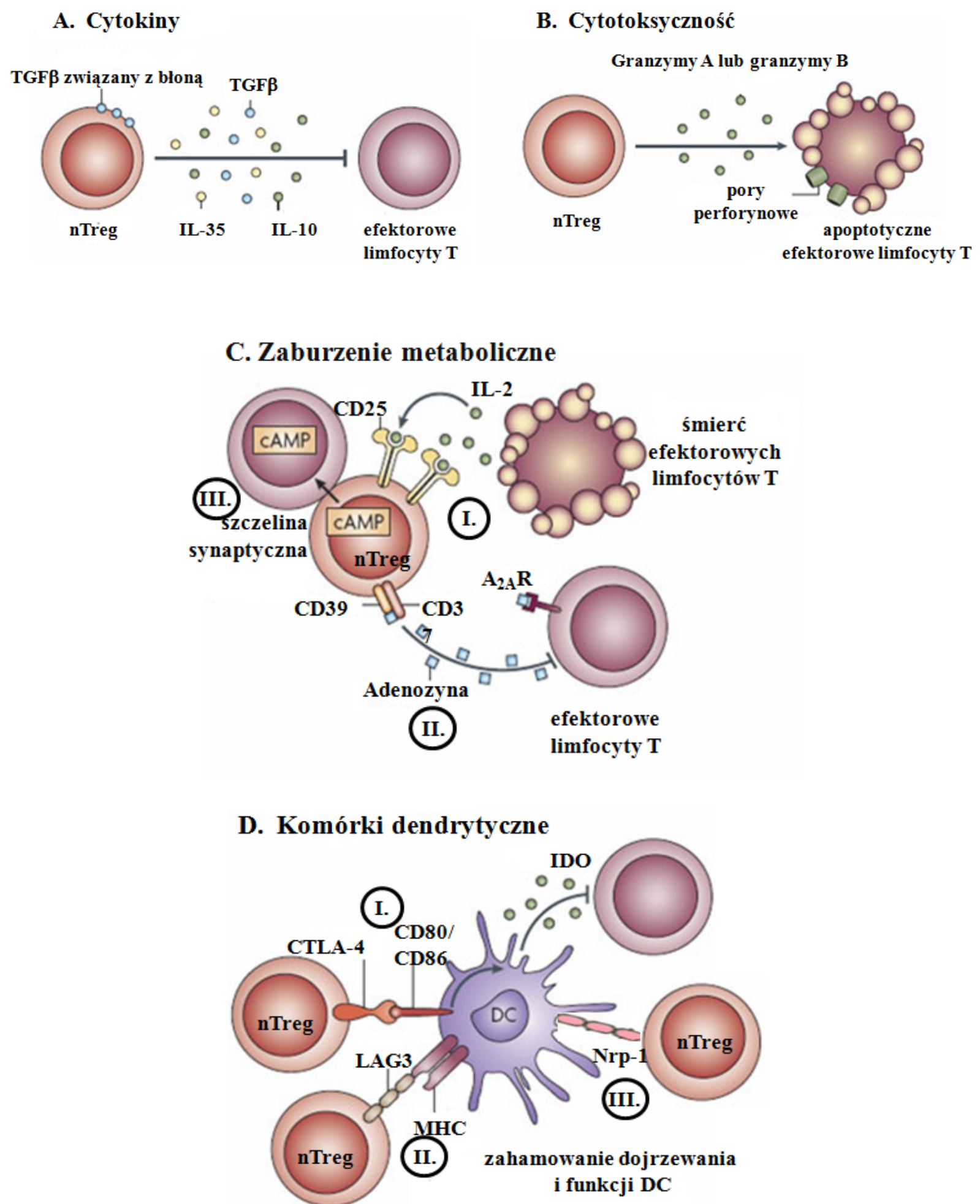
2.4.3 Zaburzenia metaboliczne w indukcji supresji

Kolejny mechanizm supresji związany jest z konkurencją nTreg o IL-2 z efektorowymi limfocytami T. Wysoka ekspresja receptora dla IL-2 (CD25) na powierzchni limfocytów nTreg umożliwia efektywne wiązanie IL-2, które jest ważne w utrzymaniu homeostazy limfocytów nTreg *in vivo* [112] i kluczowe w aktywności supresorowej *in vitro* [113]. Według części badaczy limfocyty nTreg mogą hamować efektorowe limfocyty T poprzez inaktywację transkrypcji mRNA dla IL-2 [97, 114]. Inne badania przeprowadzone w systemie hybrydowym wykazały, że regulatorowe limfocyty T człowieka są zdolne do efektywnego hamowania proliferacji efektorowych limfocytów T. Jednak dodanie ludzkiego przeciwciała anti-CD25 blokującego wiązanie IL-2 nie miało wpływu na funkcję ludzkich regulatorowych limfocytów T [115]. Tak więc kwestia udziału IL-2 w funkcji supresorowej limfocytów nTreg pozostaje ciągle niejasna (**Ryc. 4C. I**).

Inne mechanizmy, stosunkowo niedawno odkryte, polegają na indukcji wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego wydzielania nukleotydów adenozynowych. Ekspresja ektoenzymów CD39 i CD73 odpowiada za tworzenie pozakomórkowej adenozyny wiązanej przez receptory $A_{2A}R$ (adenosine receptor 2A) na efektorowych limfocytach T [116-118], co powoduje hamowanie ich funkcji efektorowych. Wiązanie adenozyny przez receptory $A_{2A}R$ hamuje ekspresję IL-6 biorącej udział w powstawaniu prozapalnych limfocytów Th17 i tym samym, indukującej wydzielanie TGF- β , który wzbudza ekspresję Foxp3 i powstawanie nTreg (**Ryc. 4C. II**) [119]. Innym sposobem supresji efektorowych limfocytów T może zachodzić przy udziale cyklicznego AMP (cAMP), który hamuje proliferację i syntezę IL-2 przez konwencjonalne limfocyty T CD4⁺. Wyniki badań wskazują, że ekspresja cAMP jest wysoka w limfocytach nTreg, natomiast niska w konwencjonalnych limfocytach T CD4⁺. W hodowli efektorowych limfocytów T CD4⁺ z limfocytami nTreg, w wyniku bezpośredniego transferu silnego inhibitora cyklicznego AMP (cAMP) poprzez połączenie między błonami obu komórek, dochodzi do wzrostu poziomu cAMP w limfocytach T CD4⁺ co wskazuje na udział cAMP w aktywności supresorowej nTreg (**Ryc. 4C. III**) [120].

2.4.4 Supresja za pośrednictwem komórek dendrytycznych

Naturalne regulatorowe limfocyty T mogą hamować funkcje efektorowe limfocytów T poprzez modulację dojrzewania i funkcji komórek dendrytycznych (DC), które wymagane są do aktywacji efektorowych limfocytów T [12]. Jedną z cząsteczek biorących udział w tym procesie jest CTLA-4, która ulega konstytutywnej ekspresji w błonie limfocytów nTreg [50, 121]. Wyniki badań wskazują, że u zwierząt z delecją *ctla-4* rozwijają się choroby autoimmunizacyjne podobne do tych, które powstają przy braku limfocytów T regulatorowych [122]. Cząsteczka CTLA-4 może uczestniczyć w aktywności supresorowej limfocytów nTreg w dwojaki sposób (**Ryc. 4D. I**). Interakcja CTLA-4 z cząsteczkami kostymulatorowymi CD80/CD86 na komórkach dendrytycznych powoduje zahamowanie lub zmniejszenie ich ekspresji. Obniżona ekspresja cząsteczek CD80 i CD86 na komórkach prezentujących antygen osłabia sygnał kostymulatorowy przeznaczony dla efektorowych limfocytów T, co prowadzi do supresji ich aktywacji [123]. Dodatkowo, interakcja CTLA-4 z cząsteczkami CD80/CD86 na komórkach prezentujących antygen powoduje indukcję enzymu 2,3-dioksygenazy indolowej (IDO). IDO katalizuje konwersję tryptofanu do kinurenin i innych pro-apoptotycznych metabolitów, co prowadzi do zahamowania aktywacji efektorowych limfocytów T [124, 125]. Kolejną cząsteczką powierzchniową zaangażowaną w supresję przy udziale komórek dendrytycznych jest LAG-3 (**Ryc. 4D. II**). LAG-3 jest homologiem CD4, wiąże z wysokim powinowactwem białko MHC klasy II niedojrzałych komórek dendrytycznych. Wiązanie LAG-3 z MHC II indukuje wewnątrzkomórkowy hamujący szlak sygnałowy za pośrednictwem sekwencji ITAM, w wyniku czego dochodzi do zahamowania dojrzewania komórek dendrytycznych i ich zdolności do aktywacji efektorowych limfocytów T. W szlaku tym stwierdzono udział receptorów FcγRγ, kinaz ERK oraz fosfataz SHP-1 [126]. Aktywność supresorowa nTreg może zachodzić również z udziałem Neuropiliny-1 (**Ryc. 4D. III**). Nrp-1 przyczynia się do wydłużenia interakcji pomiędzy limfocytem nTreg a komórką dendrytyczną, co ogranicza dostęp efektorowym limfocytom T do komórek dendrytycznych i skuteczną prezentację antygenu [127].



Ryc. 4 Mechanizmy działania limfocytów Treg ([według [128, 129])

Hamowanie efektorowych limfocytów T za pomocą cytokin (TGF- β , IL-2, IL-10) wydzielanych przez limfocyty nTreg (A). Apoptoza efektorowych limfocytów T z udziałem granzymów A lub B i perforyn (B). Hamowanie efektorowych limfocytów T poprzez zaburzenie metaboliczne: duże powinowactwo cząsteczki CD25 na limfocytach Treg do IL-2 prowadzi do apoptozy efektorowych limfocytów T (C. I); uczestnictwo ektoenzymów CD39 i CD73 obecnych na limfocytach nTreg w tworzeniu pozakomórkowej adenozyiny wiążącej receptor A₂AR na efektorowych limfocytach T prowadząc do ich supresji (C. II); hamowanie efektorowych limfocytów T za pomocą cAMP (C. III). Hamowanie efektorowych limfocytów T przy udziale komórek dendrytycznych: CTLA-4

powoduje zahamowanie bądź obniżenie ekspresji CD80/CD86 na komórkach prezentujących antygen, co zmniejsza ich zdolność do aktywacji naiwnych limfocytów T oraz interakcja CTLA-4 z CD80/CD86 indukuje enzym IDO, który katalizuje konwersję tryptofanu do kinurenin i innych pro-apoptotycznych metabolitów zdolnych do wywołania immunosupresji (**D. I**); LAG-3 aktywuje hamujący szlak sygnałowy za pośrednictwem sekwencji ITAM powodując zahamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych oraz ich zdolności do aktywacji efektorowych limfocytów T (**D. II**); Neuropilina-1 wydłuża czas interakcji pomiędzy limfocytami nTreg a komórkami dendrytycznymi, co powoduje ograniczony dostęp efektorowych limfocytów T do komórek dendrytycznych oraz blokuje prezentację antygeny przez DC efektorowym limfocytom T (**D. III**).

2.5 Rola limfocytów nTreg w immunosupresji

Zaburzenie funkcji lub nieprawidłowa liczba limfocytów nTreg ułatwia rozwój chorób autoimmunizacyjnych, alergii, chorób nowotworowych czy odrzucanie narządów przy przeszczepach [130, 131]. Szczególną uwagę poświęcono roli nTreg w chorobach autoimmunizacyjnych. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że limfocyty T regulatorowe pochodzące od chorych na cukrzycę typu I wykazują nieprawidłową funkcję supresorową wobec efektorowych limfocytów T [132, 133]. U chorych na toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów czy stwardnienie rozsiane stwierdzono zmniejszoną liczbę i aktywność supresorową limfocytów T regulatorowych [134, 135] [136]. W przypadku pacjentów chorych na miastenię odnotowano istotne zmniejszenie liczby nTreg w krwi w porównaniu z osobami zdrowymi lub pacjentami przyjmującymi leki immunosupresyjne, zwykle kortykosteroidy i azatioprynę. Zaobserwowano również, że terapeutyczna tymektomia w przypadku chorób nowotworowych lub zmienionych tkanek grasicy często towarzyszących miastenii zapobiega wzrostowi liczby krążących w krwi limfocytów nTreg obserwowanego podczas terapii immunosupresyjnej, co szczególnie widoczne jest w przypadku tymektomii nienowotworowych tkanek grasicy. Badania te wskazują, że w dużej mierze za prawidłową liczbę limfocytów nTreg odpowiada grasicca oraz kortykosteroidy, które prawdopodobnie stymulują powstawanie limfocytów nTreg [137].

Ze względu na swój potencjał terapeutyczny limfocyty nTreg są od kilku lat przedmiotem intensywnych badań [11, 138, 139]. Powszechnie stosowane w terapii immunosupresyjnej glukokortykoidy badane są również pod względem ich działania na rozwój i funkcje supresorowe limfocytów T regulatorowych. Znane są wyniki badań wskazujące na wpływ GC na liczbę i aktywność supresorową nTreg. Wykazano, że syntetyczny glukokortykoid, deksametazon podany *in vivo* powoduje zwiększenie liczby regulatorowych limfocytów T [140]. Zaobserwowano również, że GC zwiększają

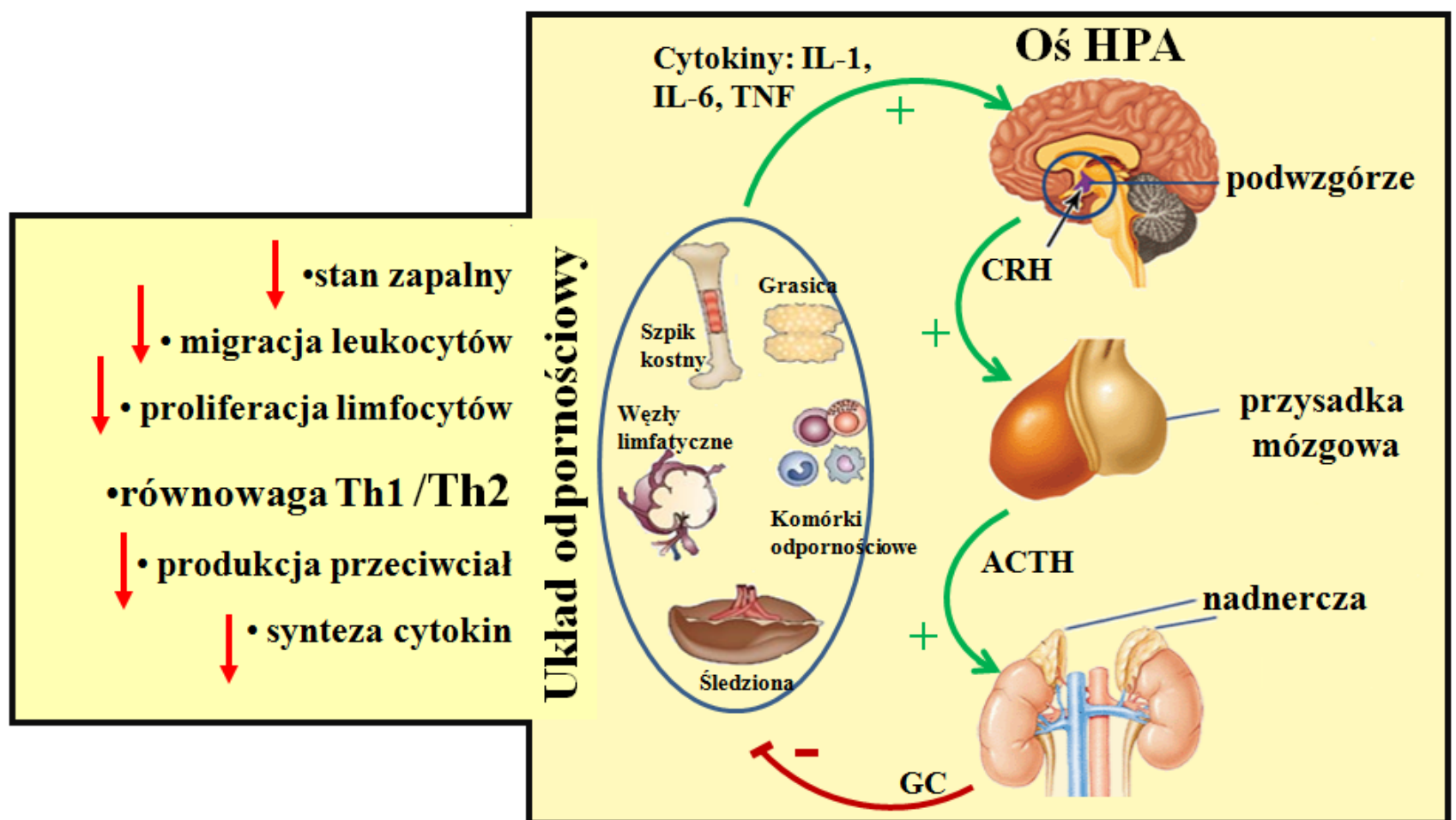
ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxp3 kluczowego w pełnieniu funkcji supresorowej przez limfocyty Treg. U pacjentów chorych na astmę, leczonych glukokortykoidami, stwierdzono w izolowanych z ich krwi limfocytach CD4+ wzrost ekspresji mRNA dla czynnika Foxp3 oraz zwiększenie liczby regulatorowych limfocytów T w krwi [141]. Natomiast w badaniach *in vitro*, preinkubacja regulatorowych limfocytów T z syntetycznymi glukokortykoidami (propionian flutikazonu) zwiększa ich aktywność supresorową wobec efektorowych limfocytów T CD4+CD25- [142].

Powszechnie stosowane leki immunosupresyjne, takie jak glukokortykoidy zwiększają liczbę i aktywność supresorową limfocytów Treg, działają jednak niespecyficznie i powodują efekty uboczne w postaci niedoboru odporności, a ich długotrwałe podawanie jest toksyczne. Poszukuje się nowych metod terapii, które umożliwiłyby skuteczniejszą i ukierunkowaną immunosupresję z wykorzystaniem limfocytów nTreg oraz leków immunosupresyjnych [143, 144].

2.6 Glukokortykoidy

2.6.1 Mechanizm działania glukokortykoidów na przebieg odpowiedzi immunologicznej

Glukokortykoidy (GC) to grupa małych, lipofilowych hormonów steroidowych biorących udział w wielu procesach fizjologicznych organizmu. Glukokortykoidy regulują metabolizm glukozy, białek, lipidów oraz pełnią ważną rolę w stanie zapalnym, rozwoju odporności wrodzonej i nabytej, indukcji apoptozy komórek układu odpornościowego, utrzymywaniu równowagi w aktywności limfocytów efektorowych Th1 i Th2. Głównym źródłem endogennych glukokortykoidów jest kora nadnerczy. Jednakże, syntetyzowane są również przez korowe komórki nabłonkowe grasicy (cTEC), komórki mózgu oraz komórki nabłonkowe układu pokarmowego [145-147]. Najnowsze wyniki badań wskazują na ich syntezę przez tymocyty oraz limfocyty T i B [148]. Synteza glukokortykoidów zachodzi w sposób rytmiczny w cyklu dobowym i znajduje się pod kontrolą osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) (**Ryc. 5**). Hamowanie funkcji wielu komórek odpornościowych przez glukokortykoidy jest jednym z podstawowych mechanizmów fizjologicznej supresji odpowiedzi immunologicznej. Podczas rozwoju odpowiedzi immunologicznej dochodzi do wytwarzania cytokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6, TNF- α czy IFN- γ , które są silnymi aktywatorami endogennych GC [149, 150]. Cytokiny mogą bezpośrednio oddziaływać na podwzgórze powodując uwalnianie hormonu kortykoliberyny (CRH). CRH z kolei pobudza wydzielanie hormonu kortykotropiny (ACTH), co w efekcie pobudza korę nadnerczy do produkcji kortyzolu czy kortykosteronu, które odpowiednio, są głównymi przedstawicielami glukokortykoidów u ludzi i myszy. Wzrost stężenia endogennych glukokortykoidów w osoczu powoduje zahamowanie odpowiedzi immunologicznej m. in. poprzez inhibicję syntezy cytokin prozapalnych, migracji i proliferacji komórek układu odpornościowego, czy przesunięcie równowagi w kierunku odpowiedzi immunologicznej typu Th2 [151, 152]. Interakcje pomiędzy układem hormonalnym a odpornościowym możliwe są dzięki występowaniu w komórkach układu odpornościowego receptorów dla hormonów, w tym również receptorów dla glukokortykoidów (GCR).



Ryc. 5 Schemat działania glukokortykoidów na odpowiedź immunologiczną

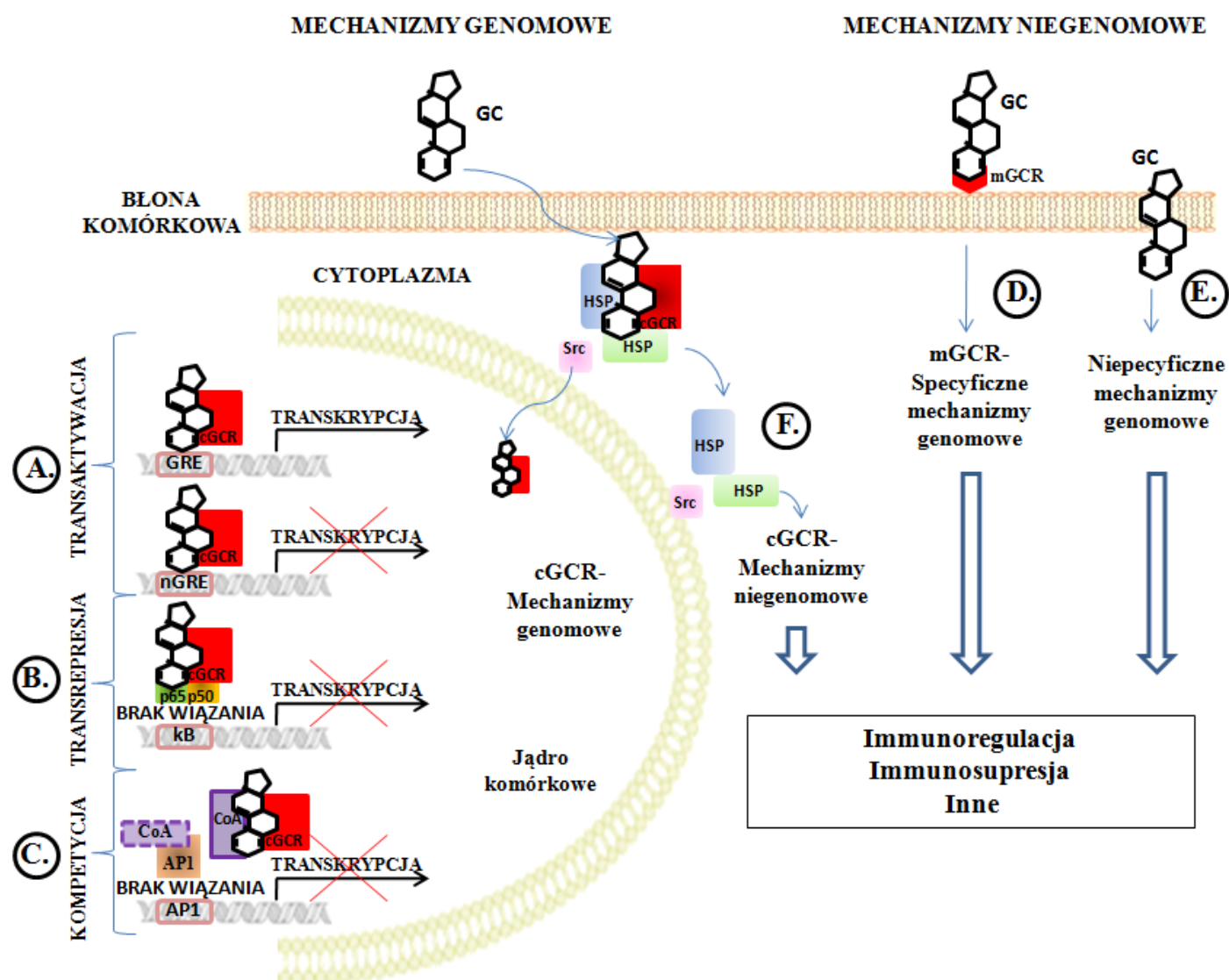
Wytwarzane przez układ odpornościowy cytokiny prozapalne IL-1, IL-6, TNF- α czy IFN- γ , oddziałują na oś HPA powodując uwalnianie hormonu kortykoliberyny (CRH) przez podwzgórze. CRH indukuje wydzielanie hormonu kortykotropiny (ACTH), co pobudza korę nadnerczy do produkcji glukokortykoidów. Wzrost stężenia endogennych glukokortykoidów w osoczu powoduje zahamowanie stanu zapalnego poprzez inhibicję syntezy cytokin prozapalnych, migracji i proliferacji komórek układu odpornościowego oraz przesunięcie równowagi w kierunku odpowiedzi immunologicznej Th2.

2.6.2 Działanie glukokortykoidów na poziomie molekularnym

Zarówno naturalne jak i syntetyczne glukokortykoidy działają poprzez niespecyficzne interakcje z błoną komórkową, specyficzne wiązanie błonowego receptora dla glukokortykoidów (mGCR) oraz wiązanie wewnątrzkomórkowego receptora dla glukokortykoidów (cGCR) (**Ryc. 6**). Receptor dla glukokortykoidów bierze udział we wszystkich procesach fizjologicznych regulowanych przez glukokortykoidy w tym również w procesach proliferacji i apoptozy komórek. GCR należy do nadrodziny receptorów jądrowych. Receptor GCR myszy (zbudowany z 9 eksonów) składa się z trzech zasadniczych domen: N-końcowej domeny transaktywacyjnej, centralnej domeny wiążącej DNA i C-końcowej domeny wiążącej ligandy (hormony) [152]. Forma nieaktywna receptora GCR występuje w cytoplazmie w kompleksie złożonym z licznych białek takich jak, p23, Src, białka szoku cieplnego (Hsp-90, Hsp-70, Hsp-56 i Hsp-40) [34]. Receptory

dla glukokortykoidów działają poprzez mechanizmy zależne (genomowe) i niezależne (niegenomowe) od interakcji z DNA skutkujące aktywacją bądź zahamowaniem ekspresji docelowych genów. Glukokortykoidy, ze względu na swoje lipofilowe właściwości swobodnie przechodzą przez błonę komórkową. Wiążą i aktywują cytoplazmatyczny GCR (cGCR) indukując odłączenie od niego białka Hsp-90 i zmianę konformacyjną prowadzącą do translokacji kompleksu do jądra komórkowego. Kompleks GC/cGCR kontroluje ekspresję genów poprzez wiązanie specyficznych palindromowych sekwencji DNA (GGTACAnnnTGTTCT) zwanych elementami rozpoznającymi glukokortykoidy (GRE). Związanie pozytywnych GRE lub negatywnych GRE powoduje odpowiednio, aktywację (transaktywacja) lub zahamowanie transkrypcji genów [34]. Transaktywacja odpowiada za różne efekty na poziomie komórki, tkanki, narządu i organizmu (indukcja syntezy białek regulatorowych biorących udział w procesach metabolicznych), a także za niektóre efekty przeciwzapalne (hamowanie syntezy białek przeciwzapalnych). Zaktywowany cGCR, w pewnych warunkach, może również hamować transkrypcję genów poprzez pośrednie lub bezpośrednie oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak AP1, NFkB czy IRF-3, które uczestniczą w regulacji genów kodujących białka prozapalne. Proces ten zwany jest transrepresją. Regulacja transkrypcji genów może odbywać się również na zasadzie konkurencji kompleksu GC/cGCR z czynnikami transkrypcyjnymi o koaktywatory jądrowe (kompetycja) [153].

Mechanizmy genomowe przebiegają bardzo wolno a widoczne zmiany na poziomie komórki, tkanki czy organizmu ujawniają się po godzinach czy dniach. Efekty niegenomowego działania glukokortykoidów występują w relatywnie krótkim czasie, minut a nawet sekund. Niegenomowe działanie glukokortykoidów prowadzi do zahamowania reakcji prozapalnej i immunosupresji. Glukokortykoidy biorą udział we wczesnej kaskadzie transdukcji sygnałów (MAPK) w czasie reakcji zapalnej, transporcie jonów sodu i wapnia, degranulacji neutrofili czy fagocytozie makrofagów. Glukokortykoidy kontrolują również migrację komórek w czasie odpowiedzi zapalnej poprzez hamowanie syntezy cząsteczek adhezyjnych takich jak ICAM-1 i selektyna-E [34, 153, 154].



Ryc. 6 Mechanizmy działania glukokortykoidów (według [153])

Receptory dla glukokortykoidów działają poprzez mechanizmy zależne (genomowe) i niezależne (nienomowe) od interakcji z DNA. GC wiążą i aktywują cytoplazmatyczny GCR (cGCR) indukując odłączenie od niego białek Hsp i zmianę konformacyjną prowadzącą do translokacji kompleksu do jądra komórkowego. Kompleks GC/cGCR wiąże elementy GRE: pozytywne GRE lub negatywne GRE powodując odpowiednio, aktywację (transaktywacja) lub zahamowanie transkrypcji genów (A). Kompleks GC/cGCR hamuje transkrypcję genów poprzez pośrednie lub bezpośrednie oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak AP1, NFκB czy IRF-3 (transrepresja) (B). Regulacja transkrypcji genów na zasadzie konkurencji kompleksu GR/cGCR z czynnikami transkrypcyjnymi o koaktywatory jądrowe (kompetycja) (C). Glukokortykoidy mogą działać poprzez specyficzne wiązanie błonowego receptora dla glukokortykoidów (mGCR) (D), niespecyficzne interakcje z błoną komórkową (E) oraz wiązanie wewnątrzkomórkowego cGCR (F). **mGCR** (membrane glucocorticoid receptor) – błonowy receptor dla glukokortykoidów; **cGCR** (cytoplasmic glucocorticoid receptor) – cytoplazmatyczny receptor dla glukokortykoidów

2.6.3 Rola glukokortykoidów w układzie odpornościowym

Wpływ glukokortykoidów na reakcje odpornościowe po raz pierwszy zaobserwowano około 150 lat temu. Wykazano, że pacjenci z niewydolnością nadnerczy mają podwyższoną liczbę limfocytów w krwi [155]. Pierwsze terapeutyczne zastosowanie glukokortykoidów opierało się na ich właściwościach przeciwzapalnych. Obecnie wiadomo, że endogenne glukokortykoidy są głównym czynnikiem immunosupresyjnym w organizmie i wpływają na szereg elementów odpowiedzi układu odpornościowego.

Syntetyczne analogi endogennych glukokortykoidów (deksametazon, betametazon, prednisolon, metylprednisolon) mają szerokie zastosowanie w terapii ostrych i przewlekłych stanów zapalnych, leczeniu chorób o podłożu autoimmunizacyjnym oraz utrzymaniu tolerancji po przeszczepie [156-158].

2.6.4 Wpływ glukokortykoidów na komórki układu odpornościowego

Glukokortykoidy ze względu na swoje właściwości immunosupresyjne pełnią ważną rolę w regulacji aktywności układu odpornościowego. Głównym celem tej regulacji jest hamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej i utrzymanie homeostazy układu odpornościowego w organizmie [159].

Udział glukokortykoidów w kontroli stanu zapalnego polega głównie na hamowaniu nadekspresji cytokin prozapalnych takich jak IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ . GC uczestniczą także w regulacji genów innych cytokin jak IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, GM-CSF i TGF- β oraz ekspresji receptorów cytokin [160]. Mechanizmy supresji wywołanej przez GC nie są do końca poznane. Wyniki badań wykazały, że przeciwzapalne i immunomodulujące działanie glukokortykoidów wynika z hamowania aktywności czynników transkrypcyjnych takich jak AP-1 (activator protein-1) i NF κ B (nuclear factor κ B). Czynniki AP-1 i NF κ B regulują wiele genów zaangażowanych w przebieg stanu zapalnego i odpowiedź efektorową komórek odporności wrodzonej i nabytej. Glukokortykoidy są wiązane przez receptory cytoplazmatyczne tworząc kompleks GC/GCR, który oddziałuje z czynnikami AP-1 i NF κ B, blokuje je i hamuje transkrypcję docelowych genów [161, 162]. Glukokortykoidy biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej także poprzez hamowanie syntezy i ekspresji cząsteczek adhezyjnych wpływając tym samym na migrację komórek układu odpornościowego. Indukowane przez cytokiny cząsteczki adhezyjne ulegają ekspresji na komórkach nabłonkowych i pełnią kluczową rolę w migracji komórek do miejsc objętych stanem zapalnym. Glukokortykoidy mogą obniżać ekspresję tych cząsteczek pośrednio, poprzez hamowanie działania cytokin (IL-1 β i TNF- α) lub bezpośrednio hamując transkrypcję genów kodujących białka ICAM-1 i selektynę-E [154]. Kolejnym mechanizmem regulacji układu odpornościowego przez glukokortykoidy jest ich wpływ na proces proliferacji i apoptozy komórek odpornościowych. Glukokortykoidy regulują w ten sposób liczbę i aktywność komórek odporności wrodzonej i nabytej (**Tabela 3**) [156, 163]. Glukokortykoidy indukują apoptozę monocytów/makrofagów, eozynofili, komórek nabłonkowych i limfocytów T.

Doniesienia dotyczące wpływu glukokortykoidów na neutrofile są sprzeczne. Według niektórych badaczy, podanie glukokortykoidów chorym na astmę powoduje zahamowanie aktywacji i migracji neutrofili. Inni badacze wykazali, że GC podtrzymują przeżywalność neutrofili. Wyniki badań *in vitro* wskazują, że traktowanie neutrofili syntetycznym GC (mometazonem) powodowało zahamowanie apoptozy [164-166]. Glukokortykoidy hamują aktywację i proliferację limfocytów T poprzez blokowanie syntezy cytokin: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 i GM-CSF. Powodują także zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC na komórkach prezentujących antygen (komórki dendrytyczne, makrofagi), co powoduje zahamowanie prezentacji antygeny w kontekście cząsteczek MHC i w konsekwencji zahamowanie aktywacji limfocytów T [35].

Odporność wrodzona	Monocyty/ Makrofagi	liczba komórek krążących w krwi (–) ekspresja MHC (–) synteza cytokin prozapalnych i prostaglandyn (–)
	Komórki NK	cytotoksyczność (–)
	Granulocyty	liczba bazofili i eozynofili (–) liczba neutrofili (+)
	Fibroblasty	prolifracja (–) synteza fibronektyny i prostaglandyn (–)
	Komórki nabłonkowe	przepuszczalność naczyń (–) ekspresja cząstek adhezyjnych (–) synteza prostaglandyn i IL-1(–)
Odporność nabyta	Limfocyty T	liczba krążących limfocytów (–) synteza IL-2 (–)
	Równowaga Th1/Th2	supresja odpowiedzi typu Th1 (–) przesunięcie równowagi w kierunku odpowiedzi typu Th2 (+)
	Limfocyty Tc	cytotoksyczność (–)
	nTreg	liczba i aktywność supresorowa (+)

Tabela 3. Wpływ glukokortykoidów na komórki układu odpornościowego (według [145, 156, 163])
(+) efekt stymulujący, (–) efekt hamujący

2.6.5 Wpływ glukokortykoidów na równowagę Th1/Th2 w układzie odpornościowym

Naiwne limfocyty Th CD4⁺ w odpowiedzi na patogeny różnicują w dwa typy limfocytów efektorowych Th1 i Th2. O przewadze różnicowania w określonym kierunku decyduje rodzaj patogenu. Limfocyty Th1 i Th2 różnią się spektrum wydzielanych cytokin i funkcją efektorową. Limfocyty Th1 wydzielają głównie IFN- γ , IL-2 i TNF- α , które wspomagają odpowiedź komórkową przeciwko mikroorganizmom, natomiast limfocyty Th2 wydzielają IL-4, IL-10, IL-13 i uczestniczą w odpowiedzi przeciwko pasożytom oraz biorą udział w regulacji odpowiedzi humoralnej. Cytokiny IL-4 i IL-10, wydzielane przez limfocyty Th2, są jednymi z najważniejszych cytokin przeciwzapalnych. Hamują aktywację makrofagów, proliferację limfocytów T i syntezę cytokin prozapalnych [167-169]. Wyniki badań wskazują, że w czasie rozwijającej się reakcji odpornościowej GC selektywnie wspomagają odpowiedź typu Th2, a hamują odpowiedź Th1. GC powodują zahamowanie produkcji cytokin przez limfocyty Th1 i komórki prezentujące antygen (monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne) [170, 171]. IL-12 produkowana przez komórki prezentujące antygen jest jedną z głównych cytokin indukujących różnicowanie limfocytów Th1. Zahamowanie syntezy IL-12 i spadek ekspresji jej receptorów na limfocytach T i komórkach NK uważane są za główny mechanizm działania GC zmieniający stan równowagi limfocytów Th1/Th2 w kierunku Th2, co skutkuje ochroną organizmu przed utrzymaniem przedłużającego się stanu zapalnego. Przesunięcie równowagi w kierunku Th2 zapobiega nadmiernej syntezie cytokin prozapalnych uwalnianych przez aktywowane makrofagi oraz chroni zdrowe tkanki organizmu przed uszkodzeniem. Środowisko cytokinowe wytwarzane przez limfocyty Th2 sprzyja rozwojowi i supresyjnemu działaniu naturalnych regulatorowych limfocytów T. Według niektórych badaczy, hamowanie odpowiedzi komórkowej Th1 może wynikać również z bezpośredniej aktywacji odpowiedzi humoralnej związanej z aktywnością limfocytów Th2, poprzez indukcję syntezy cytokin takich jak IL-4, IL-10 czy IL-13 [172].

2.6.6 Udział glukokortykoidów w rozwoju tymocytów

Endogenne glukokortykoidy pełnią ważną rolę w rozwoju grasicy i tymocytów. GC są syntezowane nie tylko przez komórki nadnerczy ale również przez korowe komórki nabłonkowe grasicy (cTEC) i tymocyty [145]. Synteza GC przez tymocyty wzrasta wraz z

wiekiem, co z kolei może być przyczyną inwolucji grasicy [148]. Wyniki badań *in vivo* wskazują, że GC pochodzenia grasiczego uczestniczą w utrzymaniu homeostazy tymocytów [173]. Wykazano również, że w grasicy dochodzi do syntezy ACTH i CRH, a komórki nabłonkowe grasicy zawierają enzymy potrzebne do syntezy GC [145]. Glukokortykoidy produkowane lokalnie w grasicy wydają się zatem niezbędne do prawidłowego rozwoju, aktywacji i przeżywalności tymocytów [145, 174-176].

Negatywna i pozytywna selekcja tymocytów jest uzależniona nie tylko od sygnału przekazywanego za pośrednictwem TCR ale również od sygnału pochodzącego od GCR. Wyjaśnia to częściowo potwierdzona hipoteza „wzajemnego antagonizmu” zakładająca, że sygnały od TCR i GCR konkurują ze sobą. Według Loewenberg i wsp. glukokortykoidy poprzez GCR mogą hamować przekazywanie sygnału od TCR. Wykazano, że GCR jest istotnym składnikiem kompleksu sygnałowego związanego z TCR. Krótkie w czasie, niegenomowe działanie glukokortykoidów powoduje rozpad tego kompleksu i zaburzenie przekazywania sygnału od TCR. Jeżeli sygnały od TCR i GCR działają osobno prowadzi to do apoptozy tymocytów, lecz gdy działają razem, sygnały te znoszą się wzajemnie. Tymocyty posiadające TCR o zbyt silnym powinowactwie do kompleksu MHC/własny peptyd będą ulegać apoptozie indukowanej przez TCR, gdyż sygnał pochodzący od GCR nie jest wystarczający by konkurować z sygnałem od TCR. Natomiast zbyt słabe powinowactwo TCR do kompleksu MHC/własny peptyd indukuje w tymocytach apoptozę zależną od glukokortykoidów. Zatem tymocyty z TCR o średnim powinowactwie do kompleksu MHC/własny peptyd będą chronione przed apoptozą, ponieważ sygnały od TCR i GCR będą się wzajemnie neutralizować [34, 35].

Komórki układu odpornościowego, a szczególnie tymocyty i limfocyty T cechuje duża wrażliwość na glukokortykoidy. Wyniki badań wskazują, że wzrost ekspresji GCR i enzymu 11 β -HSD1 w tymocytach myszy poddanych termicznemu poparzeniu (20% powierzchni ciała) prowadzi do zwiększonej wrażliwości tych komórek na apoptozę indukowaną przez glukokortykoidy [177]. Wykazano również, że wrażliwość tymocytów na działanie glukokortykoidów zależy od stopnia ich rozwoju. Najbardziej wrażliwe na indukcję apoptozy przez glukokortykoidy są tymocyty podwójnie-pozytywne DP CD4⁺CD8⁺. Traktowanie ich egzogennymi glukokortykoidami powoduje znaczący wzrost odsetka komórek apoptotycznych oraz spadek liczby tymocytów z wysoką ekspresją białka Bcl-2. Mniejszą wrażliwość na działanie glukokortykoidów wykazują najmniej dojrzałe tymocyty podwójnie-negatywne DN CD4⁻CD8⁻ i najbardziej dojrzałe tymocyty

pojedynczo-pozytywne SP CD4⁺ i SP CD8⁺. Najmniej wrażliwe na apoptozę zależną od GC okazały się regulatorowe limfocyty T, co może wynikać z większej ekspresji receptora dla GC oraz białka Bcl-2 w tych limfocytach [174, 178]. Wyniki badań *in vivo* z wykorzystaniem myszy BALB/c wskazują, że podanie deksametazonu zwiększa odsetek limfocytów T regulatorowych w grasicy oraz w obwodowych narządach limfoidalnych. W badaniach *in vitro*, przy jednoczesnym traktowaniu IL-2, limfocyty Treg nie podlegały apoptozie GC-zależnej wywołanej deksametazonem. Takiej zależności nie zaobserwowano w przypadku hodowli limfocytów T SP CD4⁺CD25⁻ [176].

Wrażliwość tymocytów na apoptozę GC-zależną może korelować z ekspresją receptora dla glukokortykoidów. W warunkach fizjologicznych, najmniejsza ekspresja GCR występuje w tymocytach DP, średnia w SP CD4⁺ i SP CD8⁺, większa występuje w DN, a największa w tymocytach nTreg [174, 179]. Wyniki badań *in vivo* wskazują, że dootrzewnowe podanie syntetycznych GC powoduje zmianę ekspresji receptora dla GC na poziomie syntezy mRNA oraz białka. Zaobserwowano, że w tymocytach SP CD4⁺, SP CD8⁺ i DN poziom ekspresji GCR maleje, natomiast w tymocytach DP pozostaje bez zmian. Przypuszcza się, że różnica we wrażliwości tymocytów na GC może wynikać z występowania w tymocytach SP i DN nieznanego mechanizmu autoregulacji. Zauważono, że w środowisku dużego stężenia GC, po podaniu deksametazonu, w tymocytach SP i DN dochodzi do zmniejszenia ekspresji receptorów dla GC. Takiej regulacji nie zaobserwowano w tymocytach DP. Poziom ekspresji GCR w tych tymocytach nie zmieniał się po podaniu deksametazonu, co może skutkować ich zwiększoną wrażliwością na indukcję apoptozy zależną od GC [180].

Mechanizmy działania GC na różne komórki odpornościowe nie są w pełni poznane. Dotyczy to również działania tych hormonów na rozwój i funkcje nTreg.

2.6.7 Wpływ glukokortykoidów na limfocyty nTreg zależny od płci

Hormony płciowe mają wpływ na rozwój i funkcjonowanie układu odpornościowego. Estrogeny i prolaktyna przeważające u osobników płci żeńskiej w stężeniach fizjologicznych zwiększają aktywność układu odpornościowego. Limfocyty samic o wiele silniej reagują na antygeny, co przejawia się zwiększoną syntezą przeciwciał, poziomem odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Androgeny, przeważające u osobników płci męskiej w warunkach fizjologicznych stężeń hamują aktywność układu odpornościowego. Działają proapoptotycznie hamując proliferację tymocytów, co powoduje zmniejszenie

liczby dojrzałych tymocytów migrujących do obwodowych narządów limfoidalnych. Tymocyty samic są mniej wrażliwe na apoptozę indukowaną przez glukokortykoidy niż samców, co jest skutkiem działania progesteronu [181, 182]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że androgeny mogą regulować syntezę GC przez same tymocyty i pełnić ważną rolę w utrzymaniu homeostazy tymocytów. Zaobserwowano, że kastracja myszy powoduje zmniejszenie stężenia enzymów szlaku syntezy glukokortykoidów. Powoduje to zahamowanie syntezy GC przez tymocyty. Po kastracji odnotowano przyrost tkanki grasicy oraz nasilenie tymopoezy przejawiające się zwiększeniem liczby tymocytów w grasicy. Po podaniu testosteronu kastrowanym myszom odnotowano zahamowanie proliferacji tymocytów w korze oraz zwiększenie poziomu apoptozy tymocytów w rdzeniu grasicy [183].

Aktualnie niewiele wiadomo na temat różnic w aktywności supresorowej limfocytów Treg w zależności od płci. Wiadomo, że limfocyty nTreg samic są mniej wrażliwe na apoptozę GC-zależną w porównaniu do nTreg samców. Estrogeny zwiększają aktywność supresorową limfocytów nTreg. Podczas ciąży, gdy poziom estrogenów wzrasta dochodzi do zwiększenia proliferacji i aktywności supresorowej limfocytów nTreg. Wyniki badań *in vitro* i *in vivo* wskazują, że traktowanie limfocytów nTreg 17- β estradiolem (E2) zwiększa ich zdolność do supresji efektorowych limfocytów T [184]. Badania z wykorzystaniem myszy z doświadczalnym autoimmunizacyjnym zapaleniem mózgu i rdzenia kręgowego (EAE, experimental allergic encephalomyelitis) wskazują, że limfocyty nTreg samic wykazują większą aktywność supresorową niż samców [185].

Pomimo różnic płciowych, traktowanie myszy syntetycznymi glukokortykoidami zwiększa aktywność supresorową limfocytów nTreg u obu płci. Równoczesna iniekcja deksametazonem i IL-2 myszy po przeszczepach allogenicznym wzmacnia aktywność supresorową limfocytów T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vivo*. Wykazano, że traktowanie dawców, przed pobraniem narządów, deksametazonem i IL-2 przyczynia się do dłuższego przeżycia i większej supresji reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) u biorców [186]. Podobnie u myszy chorych na EAE podanie deksametazonu i IL-2 indukowało ekspansję i zwiększało aktywność supresorową limfocytów T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ [85]. Stosowanie w leczeniu immunosupresyjnym IL-2 i deksametazonu wraz z limfocytami nTreg może stanowić nowy sposób terapii chorób autoimmunizacyjnych i reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi.

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Wzajemne oddziaływania układu odpornościowego, nerwowego i hormonalnego warunkują utrzymanie homeostazy organizmu. Grasica jest narządem, w którym krzyżują się wpływy tych trzech układów, a dodatkowo pełni ona funkcje centralnego narządu limfoidalnego i gruczołu wydzielania wewnętrznego jednocześnie. Jest głównym miejscem dojrzewania i różnicowania limfocytów T: konwencjonalnych SP CD4⁺ i SP CD8⁺ oraz naturalnych regulatorowych limfocytów T (nTreg). Grasica, jako narząd endokrynowy wpływa na działanie osi HPA i HPG poprzez grasiczne hormony, adrenokortykotropinę (ACTH) i kortykoliberynę (CRH) wydzielane przez korowe komórki nabłonkowe grasicy (cTEC). Z kolei oś HPA reguluje rozwój, involucję oraz endokrynową funkcję grasicy. Pod kontrolą osi HPA w rytmie okołodobowym zachodzi synteza glukokortykoidów (GC). Największy poziom wydzielania GC przypada na początek fazy aktywności, który u ludzi występuje rano natomiast u myszy wieczorem. Wydzielanie glukokortykoidów jest jednym z podstawowych mechanizmów neuroendokrynowej regulacji układu odpornościowego, co przejawia się dobowymi wahaniami w rozwoju, rozkładzie i funkcji wielu komórek odpornościowych [5]. Wyniki badań nad rolą rytmu dobowego w aktywności komórek odpowiedzi wrodzonej wskazują na rytmiczność syntezy granzymu B i perforyn przez komórki NK szczurów [187, 188]. Zaobserwowano także, że odpowiedź mysich makrofagów pochodzących z jamy otrzewnowej na stymulację LPS wykazuje charakterystyczną zmienność w cyklu dobowym [189, 190]. Wskazuje się również na znaczenie rytmów biologicznych w rozwoju i funkcji komórek odpowiedzi nabytej. U ludzi rytm dobowy wpływa na migrację leukocytów, co skutkuje wzrostem liczby krążących limfocytów Th oraz B w nocy oraz cytotoksycznych limfocytów T w dzień [5].

Do tej pory, najlepiej poznane fizjologiczne mechanizmy supresji układu odpornościowego związane są z działaniem glukokortykoidów i limfocytów T regulatorowych [101, 162]. Limfocyty nTreg hamują nadmierną odpowiedź immunologiczną i pełnią ważną rolę w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego [11-13]. Wyniki badań prowadzonych przez wielu badaczy wskazują na rolę glukokortykoidów w modulacji aktywności limfocytów nTreg. Wykazano, że glukokortykoidy wpływają stymulująco na ekspresję Foxp3 [140, 141], który jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za powstawanie i funkcję supresorową limfocytów nTreg [38, 44].

Na podstawie opublikowanych wyników badań innych badaczy oraz wstępnych eksperymentów wykonanych w Zakładzie Immunologii UW wysunięto następującą hipotezę :

Rozwój i aktywność supresorowa naturalnych regulatorowych limfocytów T wykazuje rytmiczność zależną od pory dnia. Rytmiczne zmiany aktywności supresorowej limfocytów nTreg uczestniczą w zmiennej aktywności układu odpornościowego zależnej od pory dnia. W procesie rozwoju i regulacji rytmicznych zmian aktywności supresorowej limfocytów nTreg uczestniczą glukokortykoidy.

Badanie rytmiczności rozwoju i aktywności supresorowej nTreg myszy zaplanowano w dwóch wybranych punktach czasowych odpowiadających najmniejszemu i największemu stężeniu endogennych glukokortykoidów. Działanie glukokortykoidów na rozwój i aktywność supresorową nTreg analizowano po traktowaniu zwierząt syntetycznym glukokortykoidem.

W celu zweryfikowania hipotezy badawczej przeprowadzono eksperymenty mające na celu:

I. Określenie wpływu pory dnia na odsetek i aktywność supresorową limfocytów nTreg poprzez:

1. Ocenę odsetka głównych populacji tymocytów i limfocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+ w zależności od pory dnia
2. Ocenę poziomu apoptozy w głównych populacjach tymocytów i nTreg w zależności od pory dnia
3. Ocenę aktywności supresorowej nTreg w zależności od pory dnia
4. Oznaczenie stężenia kortykosteronu w zależności od pory dnia
5. Ocenę ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w głównych populacjach tymocytów i nTreg w zależności od pory dnia

II. Określenie wpływu syntetycznego glukokortykoidu, deksametazonu, na odsetek i aktywność supresorową limfocytów nTreg w zależności od pory dnia poprzez:

1. Ocenę odsetka głównych populacji tymocytów i limfocytów nTreg CD4+CD25+FoxP3+ myszy traktowanych deksametazonem

2. Ocenę poziomu apoptozy w głównych populacjach tymocytów i nTreg myszy traktowanych deksametazonem
3. Ocenę aktywności supresorowej nTreg myszy traktowanych deksametazonem
4. Oznaczenie stężenia kortykosteronu i deksametazonu w osoczu myszy traktowanych deksametazonem
5. Ocenę ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w głównych populacjach tymocytów i nTreg myszy traktowanych deksametazonem

4. MATERIAŁY i METODY

4.1 Zwierzęta

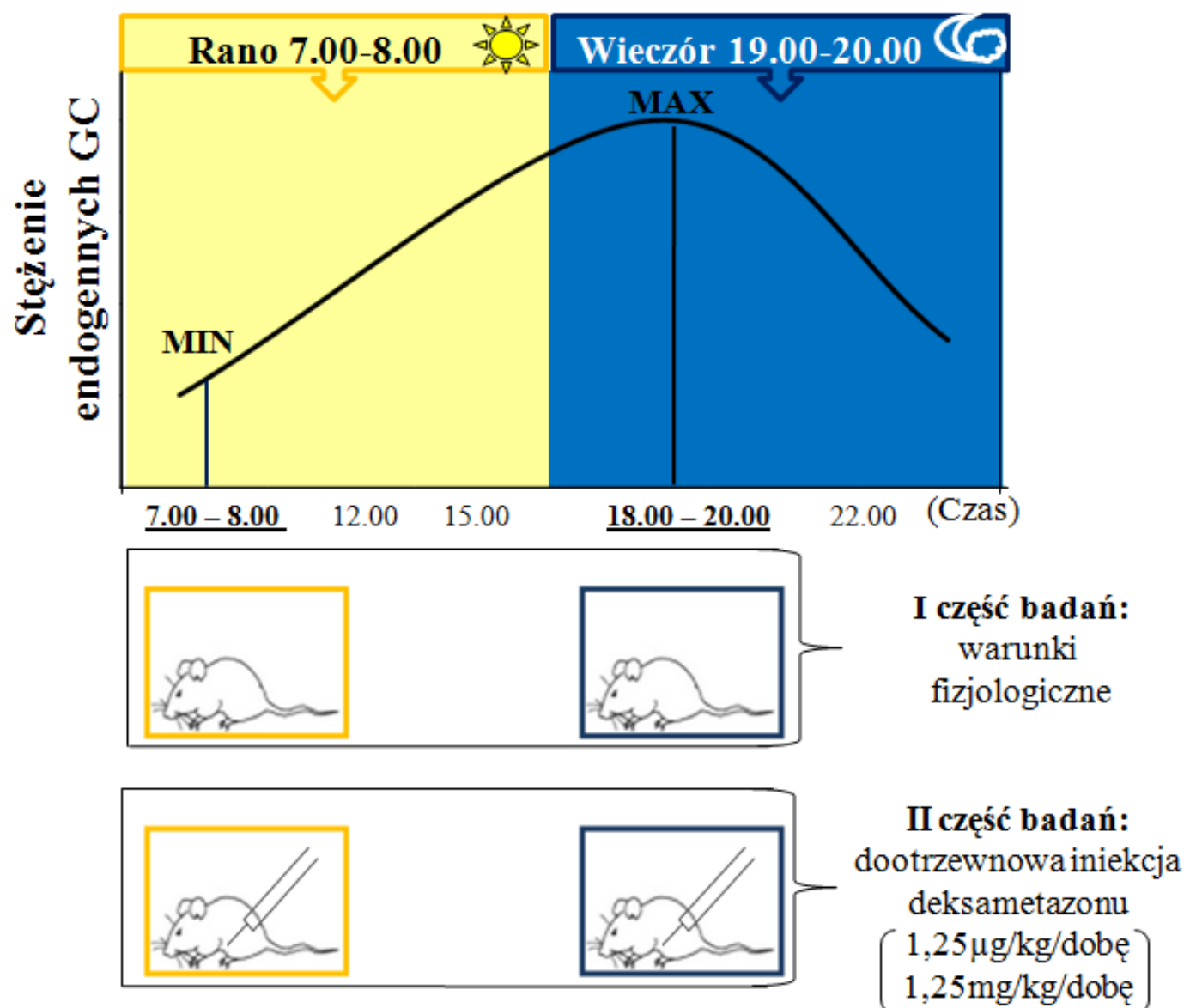
Do badań użyto myszy obu płci szczepów C57BL/6 i BALB/c w wieku 8-10 tyg. Myszy hodowano w systemie indywidualnie wentylowanych klatek w warunkach SPF (*semi pathogen free*) w temperaturze 22°C (+/- 2°C) w warunkach fotoperiodu 12/12h światła/ciemności. Pokarm i wodę dostarczano *ad libitum*.

Zwierzęta traktowano zgodnie z polskimi normami dotyczącymi doświadczeń na zwierzętach. Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną.

4.2 Schemat badań

W celu weryfikacji hipotezy badawczej eksperymenty wykonano w dwóch punktach czasowych, rano i wieczorem wybranych na podstawie najmniejszego i największego stężenia endogennych glukokortykoidów (GC) w osoczu krwi. U myszy, odwrotnie niż u ludzi, poziom glukokortykoidów w osoczu krwi rano jest niski, a wieczorem wysoki. Poziom endogennych GC jest podobny u większości szczepów myszy. Niewielkie różnice zależne są od wieku, płci, sezonu i aktywności biologicznej. Najmniejsze fizjologiczne stężenie obserwuje się pomiędzy 5.00 – 7.00 rano, a największe pomiędzy 17.00-19.00 wieczorem [191]. Na podstawie danych literaturowych oraz przy uwzględnieniu możliwości technicznych, rano pobierano narządy od godziny 7.00 do 8.00, a wieczorem od 19.00 do 20.00. Badania składały się z dwóch części doświadczalnych (**Ryc. 7**). W pierwszej części badania prowadzono w warunkach fizjologicznych, w których analizowano zmiany w rozwoju i funkcji nTreg w wybranych dwóch punktach czasowych opisanych powyżej. Druga część badań dotyczyła wpływu egzogennych GC na rozwój i funkcje nTreg w grupie myszy traktowanych dootrzewnowo syntetycznym glukokortykoidem – deksametazonem (Dex, Sigma). Grupę kontrolną dla tej części badań stanowiły myszy, którym dootrzewnowo podawano PBS w celu wykluczenia objawów stresu wynikającego z samej iniekcji oraz myszy nietraktowane. Różnice wyników dotyczące badanych parametrów pomiędzy grupami kontrolnymi (PBS i nietraktowane) były małe i nieistotne statystycznie. W związku z tym wyniki uzyskane w eksperymentach w drugiej części badań porównywano jedynie z grupą kontrolną myszy po dootrzewnowej iniekcji PBS. Użyte w doświadczeniach dawki deksametazonu wybrano na podstawie

dostępnych danych literaturowych oraz wcześniej przeprowadzonych badań wstępnych. Zastosowane w badaniach *in vivo* dawki deksametazonu, 1.25 mg/kg/dobę i 1.25 μ g/kg/dobę, mieszczą się w zakresie dawek stosowanych przez innych badaczy (0,05 – 5 mg/kg/dobę) [176] [192] [193].



Po 24 godzinach po iniekcji deksametazonu badano:

- Rozkład głównych populacji tymocytów i nTreg
- Rozwój limfocytów nTreg
- Stężenie glukokortykoidów (kortykosteronu i deksametazonu) w osoczu
- Wrażliwość tymocytów na apoptozę indukowaną przez GC
- Ekspresję receptorów dla glukokortykoidów w głównych populacjach tymocytów i nTreg
- Aktywność supresorową nTreg

Ryc. 7 Schemat badań

4.3 Pobieranie materiału do badań

Myszy uśmiercano przy użyciu CO₂. W badaniach wykorzystywano grasice, węzły chłonne pachowe oraz krew. Wyizolowane narządy umieszczano w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS), a następnie homogenizowano za pomocą szklanych homogenizatorów. Zawiesiny komórek oczyszczano z fragmentów tkanek poprzez filtrację przez sitko o średnicy porów 50µm (Becton-Dickinson). Komórki izolowane z narządów limfoidalnych liczono w komorze Bürkera po wybarwieniu jąder komórkowych płynem Türka. Następnie przygotowywano zawiesinę komórek o odpowiedniej gęstości w PBS, a ich żywotność oznaczano metodą barwienia 0,4% roztworem błękitu trypanu.

4.4 Określanie fenotypu głównych populacji tymocytów oraz naturalnych regulatorowych limfocytów T

Główne populacje tymocytów (DN, DP, SP CD4+, SP CD8+) charakteryzowano na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych: CD4 i CD8. Do znakowania markerów powierzchniowych użyto przeciwciał monoklonalnych (BD Pharmingen) sprzężonych z fluorochromami: anti-CD4/FITC i anti-CD8/PercP.

Fenotyp naturalnych regulatorowych limfocytów T CD4+CD25+Foxp3+ oznaczono na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych: CD4, CD8, CD25 oraz wewnątrzkomórkowych: Foxp3. Do znakowania markerów powierzchniowych użyto przeciwciał monoklonalnych (BD Pharmingen) sprzężonych z fluorochromami: anti-CD4/FITC; anti-CD8/PerCP; anti-CD25/APC (BD Pharmingen) oraz anti-Foxp3/PE (BioLegend).

Standardowo w badaniach stosowano przeciwciała monoklonalne o stężeniu 0,5µg p-ciała/10⁶ tymocytów. Przygotowane w buforze do znakowania (Cell wash, Becton-Dickinson) zawiesiny tymocytów inkubowano z mieszaniną przeciwciał 30 min. w temp 4°C w ciemności. Po inkubacji tymocyty płukano 3-krotnie, a ekspresję markerów określano na podstawie emisji fluorescencji przez fluorochromy sprzężone z przeciwciałami. Analizę przygotowanych prób komórek wykonano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton-Dickinson). Wyniki analizowano za pomocą programu CELLQuest. Rozkład głównych populacji tymocytów podano w odsetkach.

4.5 Oznaczanie poziomu apoptozy w populacjach tymocytów

Komórki apoptotyczne identyfikowano metodą znakowania jodkiem propidyny i aneksyną-V (An-V). Poziom apoptozy oznaczano w głównych populacjach tymocytów oraz populacji nTreg. W tym celu znakowanie komórek przeprowadzono dwustopniowo: 1/ znakowano markery powierzchniowe za pomocą przeciwciał: anty-CD4/FITC: anty-CD8/FITC lub PerCP i anty-CD25/APC; 2/ Znakowano komórki apoptyczne aneksyną-V sprzężoną z fikoerytryną – PE (Annexin-V PE Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen) o stężeniu 0,5 µg p-ciała/10⁶ tymocytów. Inkubowano w ciemności 15 min. w temperaturze pokojowej. Aneksyna wiąże fosfatydyloserynę, która ulega przesunięciu na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej we wczesnym etapie apoptozy. Wyniki analizowano w programie CellQuest w cytometrze FACSCalibur.

4.6 Analiza ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w populacjach tymocytów

Do identyfikacji receptorów dla GC zastosowano technikę cytometrii przepływowej opartą na inkubacji tymocytów z deksametazonem skoniugowanym z fluorochromem. Kompleks deksametazon/fluoresceina (Dex/FITC) wnika do komórek i wiąże wewnątrzkomórkowe receptory dla GC. Do 4x10⁶ tymocytów zawieszonych w 0,5 ml PBS dodawano odpowiednie stężenie roztworu Dex-FITC (Invitrogen) i inkubowano w ciemności przez 15 min. w 4°C. Wnikanie kompleksu przerywano poprzez 5-krotne rozcieńczenie próby PBS, a następnie dwukrotnie płukano PBS (8 min., 4°C, 1800 rpm) [179]. Do pomiaru fluorescencji użyto FACSCalibur, a wyniki analizowano za pomocą programu CELLQuest.

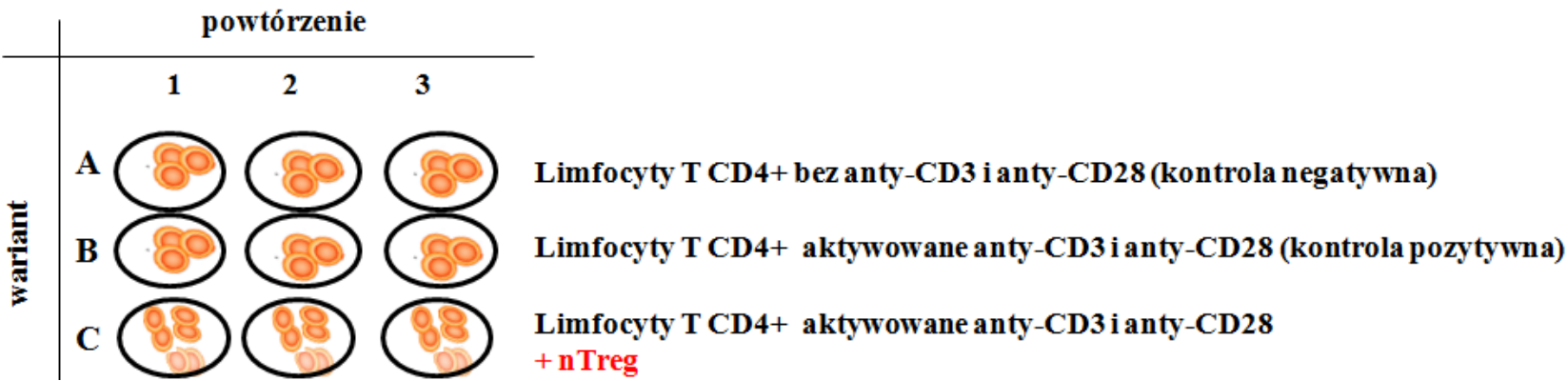
4.7 Określenie aktywności supresorowej nTreg w teście hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów T węzłów chłonnych

Wyizolowane z węzłów chłonnych limfocyty T CD4⁺ zawieszano w ilości 2,5x10⁵ komórek/ml w pełnym podłożu (5 ml 10% FBS, 10 µl 2-ME, 0,5 ml Hepes 1M, 0,5 ml Penicylina/Streptomycyna, 34 ml RPMI 1640 Glutamax-I; firmy Gibco). Do indukcji proliferacji limfocytów węzłów chłonnych zastosowano przeciwciała anty-CD3 i anty-CD28 w stężeniu odpowiednio, 0,5 µg/ml i 0,05 µg/ml (BD Pharmingen). Poziom proliferacji mierzono metodą znakowania limfocytów T węzłów chłonnych barwnikiem fluorescencyjnym CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). Znakowanie

przeprowadzano przy użyciu zestawu CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta. Brawnik fluorescencyjny CFSE jest powszechnie stosowaną metodą do oznaczania proliferacji komórek [194, 195] [196]. CFSE po wniknięciu do żywych komórek jest trwale wiązany przez białka znajdujące się w cytoplazmie. Po podziale CFSE pozostaje w komórkach potomnych w równych ilościach, co umożliwia analizę proliferacji w cytometrze przepływowym na podstawie zmniejszenia intensywności fluorescencji emitowanej przez komórki potomne.

W celu określenia aktywności supresorowej wyizolowanych z grasicy nTreg zakładano następujące rodzaje hodowli: 1/ kontrola negatywna – nieaktywowane limfocyty T CD4+ węzłów chłonnych; 2/ kontrola pozytywna (kontrola proliferacji) limfocyty T CD4+ aktywowane przeciwciałami anty CD3 i anty CD28; 3/ mieszana hodowla limfocytów węzłów chłonnych T CD4+ i limfocytów nTreg. Limfocyty T CD4+ węzłów chłonnych i limfocyty nTreg hodowano w proporcji 5:1 ($25 \times 10^3 / 5 \times 10^3$ komórek/ml) (**Ryc. 8**). Hodowle prowadzono na okrągłodennej płytce 96 dołkowej w końcowej objętości 200 μ l w 37°C i 5% CO₂. Poziom proliferacji limfocytów T CD4+ analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton-Dickinson) po 72h hodowli, a analizę przeprowadzono przy użyciu programu CellQuest. Aktywność supresorową nTreg przedstawiono w postaci odsetka hamowania proliferacji liczoną zgodnie z wzorem [197]:

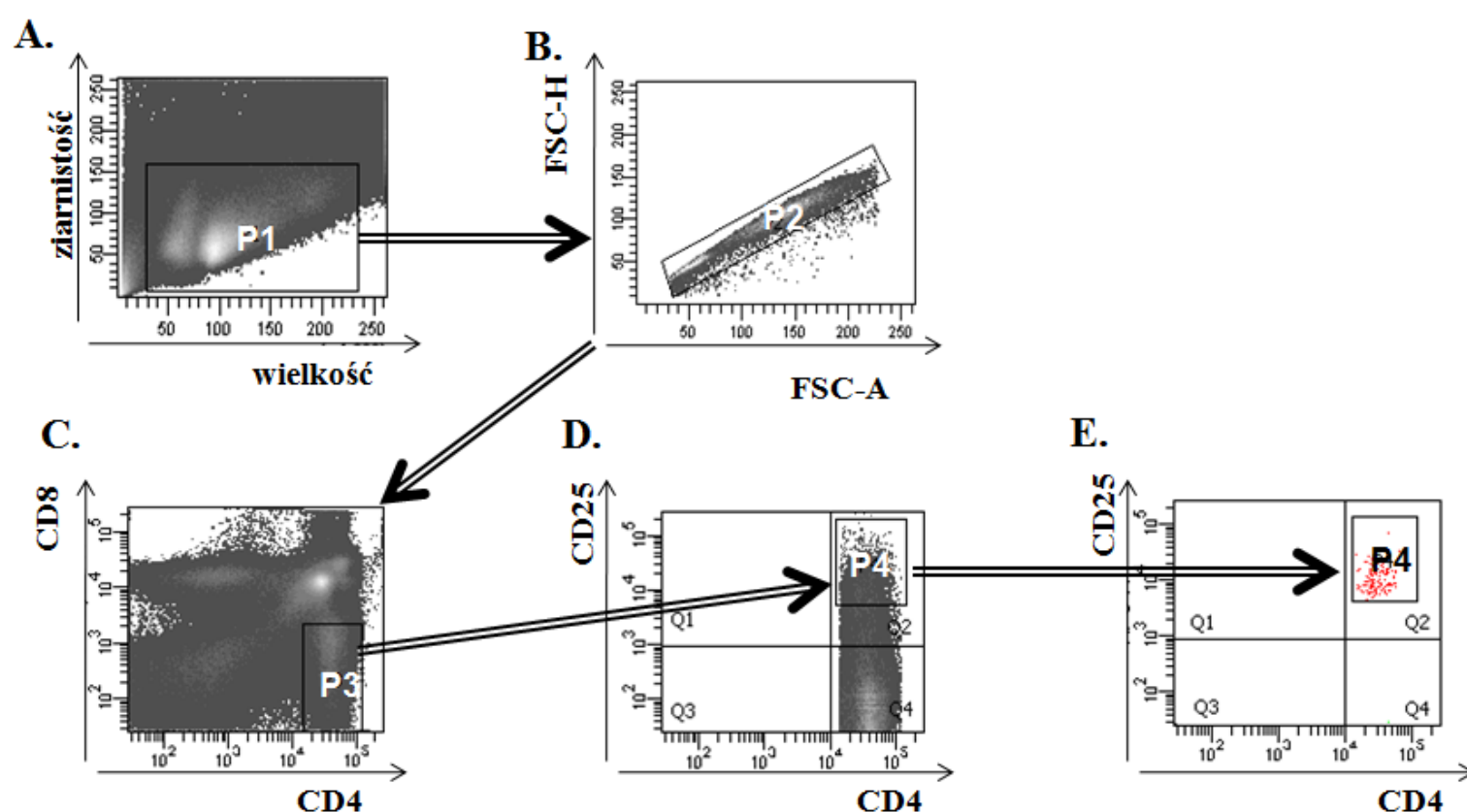
$$\% \text{ hamowania} = 100 - \frac{\% \text{ proliferacji limfocytów w obecności nTreg}}{\% \text{ proliferacji limfocytów T CD4+}} \times 100$$



Ryc. 8 Badanie aktywności supresorowej nTreg: schemat doświadczenia

4.7.1 Sortowanie nTreg

Limfocyty nTreg izolowano z grasicy. Tymocyty znakowano przeciwciałami monoklonalnymi: anti-CD4/PE, anti-CD8/PerCP i anti-CD25/Pe-Cy7, a następnie sortowano nTreg na podstawie fenotypu CD4⁺CD25^{high} (dojrzałe nTreg charakteryzują się wysoką ekspresją CD25) za pomocą sortera FACS Aria (**Ryc. 9**).



Ryc. 9 Schemat sortowania limfocytów nTreg

Wyznakowane tymocyty ($60-100 \times 10^6$) poddawano sortowaniu przy użyciu FACS Aria: **A** – identyfikacja populacji tymocytów (P1); **B** – eliminacja dubletów (P2); **C** – oznaczenie populacji limfocytów T CD4⁺ (P3); **D** – w populacji SP CD4⁺ wyodrębniono tymocyty o wysokiej ekspresji CD25 (P4) charakteryzujące się ekspresją Foxp3; **E** – sortowane limfocyty nTreg (P4).

4.8 Oznaczenie stężenia kortykosteronu i deksametazonu w osoczu krwi metodą immunoenzymatyczną ELISA

Stężenie glukokortykoidów oznaczono w osoczu uzyskanym z pobieranej w trakcie badań krwi i przechowywanej w temp. -80°C . Próbkę osocza ekstrahowano przy użyciu eteru etylu w celu oznaczenia kortykosteronu za pomocą zestawu Corticosterone ELISA Kit (Neogen Corporation) i postępowano zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Do oznaczenia stężenia deksametazonu zastosowano Dexamethasone ELISA Kit (Neogen Corporation) i również postępowano zgodnie z procedurą wskazaną przez producenta. Gęstość optyczną (OD) prób mierzone za pomocą spektrofotometru VICTOR 3 Multilabel Plate Readers. Pomiar wykonano przy długości fali 450nm.

Oznaczenia wykonano w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii UW.

4.9 Analiza statystyczna wyników

Doświadczenia na myszach wykonano w trzech powtórzeniach po 3-4 osobniki w grupie. W niezależnie przeprowadzonych doświadczeniach otrzymano porównywalne wyniki. Dane przedstawiono w postaci średnich \pm odchylenie standardowe (SD). Do oceny istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami wyników w zależności od kilku zmiennych: pory dnia, płci, szczepu myszy lub podania deksametazonu, zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji – ANOVA przy użyciu programu STATISTICA (StatSoft, Inc., 2007- STATISTICA, version 8.0.) Istotność statystyczną jednej pary zmiennych pomiędzy dwoma grupami (poranną a wieczorną) stwierdzono za pomocą testu t-Studenta. Zastosowano tzw. LSD test (Fisher's Least Significant Difference Test, Fisher, 1949).

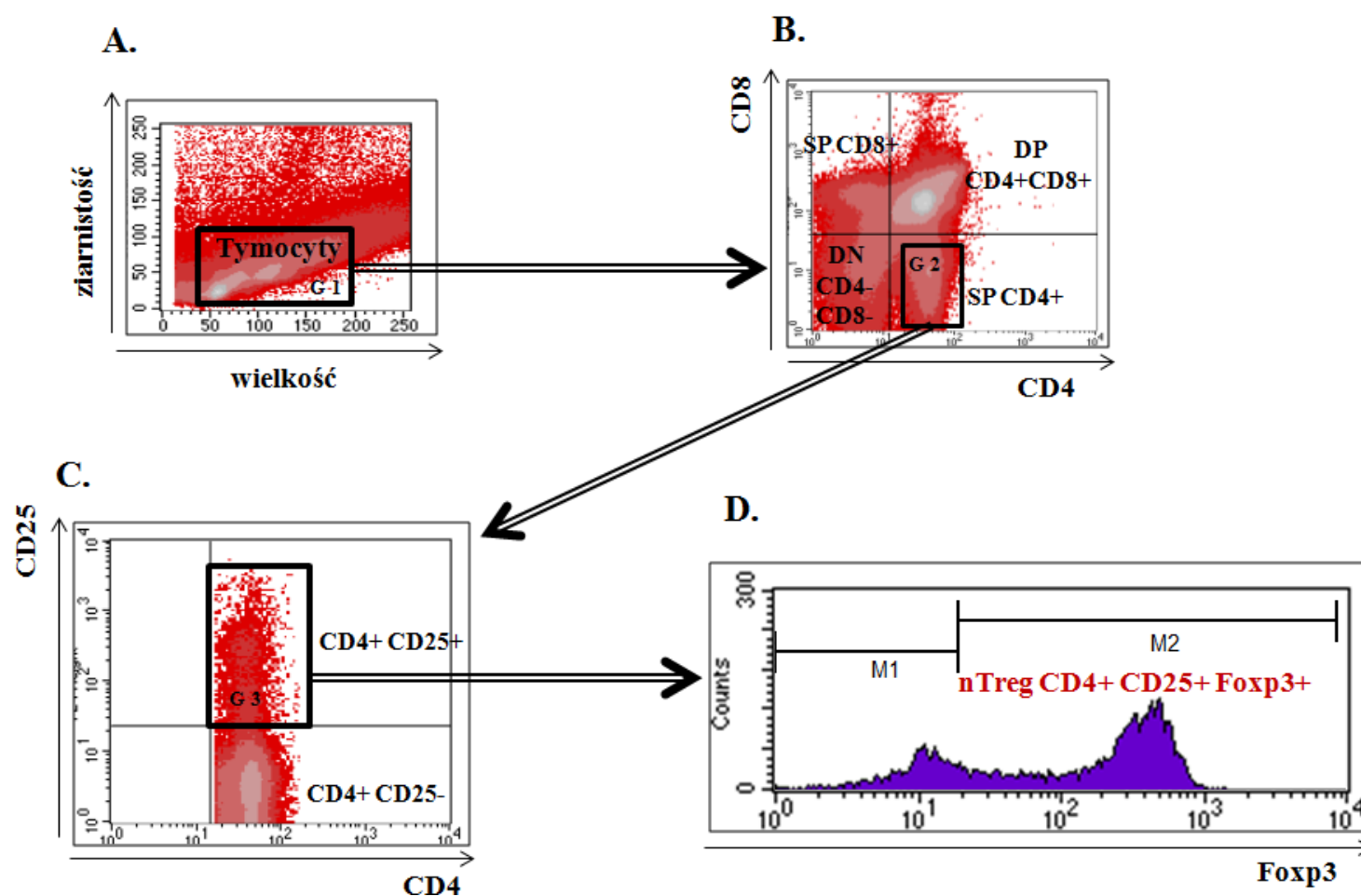
Różnice wyników uznano za istotne statystycznie przy $P < 0,05$. Dla czytelności wykresów zmiany oznaczono za pomocą odpowiednich symboli w zależności od:

pory dnia (w obrębie tej samej płci i szczepu myszy)	▲ $P < 0,05$	<div> <div> samce rano ☀ samice rano ☀ </div> <div> vs vs </div> <div> samce wieczór 🌙 samice wieczór 🌙 </div> </div>
płci (pomiędzy płciami tego samego szczepu myszy)	★ $P < 0,05$	<div> <div> samce ♂ rano samce ♂ wieczór </div> <div> vs vs </div> <div> samice ♀ rano samice ♀ wieczór </div> </div>
szczepu myszy (pomiędzy szczepami myszy)	* $P < 0,05$	C57BL/6 vs BALB/c
podania deksametazonu (Dex) (pomiędzy kontrolą i grupą traktowaną Dex w obrębie tej samej płci i szczepu myszy)	● $P < 0,05$	kontrola vs po Dex

5. WYNIKI

5.1 Analiza rozwoju głównych populacji tymocytów i naturalnych regulatorowych limfocytów T

Celem pierwszej części pracy była weryfikacja hipotezy zakładającej występowanie rytmiczności rozwoju nTreg w dwóch wybranych punktach czasowych odpowiadających najmniejszemu i największemu stężeniu endogennych glukokortykoidów. Porównano etapy rozwoju głównych populacji tymocytów oraz nTreg dwóch prototypowych szczepów myszy obu płci C57BL/6 i BALB/c różniących się typem odpowiedzi immunologicznej, odpowiednio Th1 i Th2. Limfocyty Th1 biorą głównie udział w rozwoju odpowiedzi typu komórkowego, natomiast limfocyty Th2 indukują odpowiedź typu humoralnego. Oba typy limfocytów różnią się spektrum syntezowanych cytokin. Limfocyty Th1 produkują przede wszystkim IFN- γ , IL-2 i TNF- α , a limfocyty Th2 – IL-4, IL-10 i IL-13. Etapy rozwoju głównych populacji tymocytów identyfikowano na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych CD4 i CD8: najmniej zróżnicowane DN CD4-CD8-, przejściowy etap rozwoju DP CD4+CD8+ i dojrzałe SP CD4+ i SP CD8+. W populacji SP CD4+ na podstawie ekspresji CD25 i Foxp3 oznaczano naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg CD4+CD25+Foxp3+). Schemat analizy rozwoju głównych populacji tymocytów oraz nTreg przedstawiono na **rycinie 10**.



Ryc. 10 Schemat analizy głównych populacji tymocytów i naturalnych regulatorowych limfocytów T

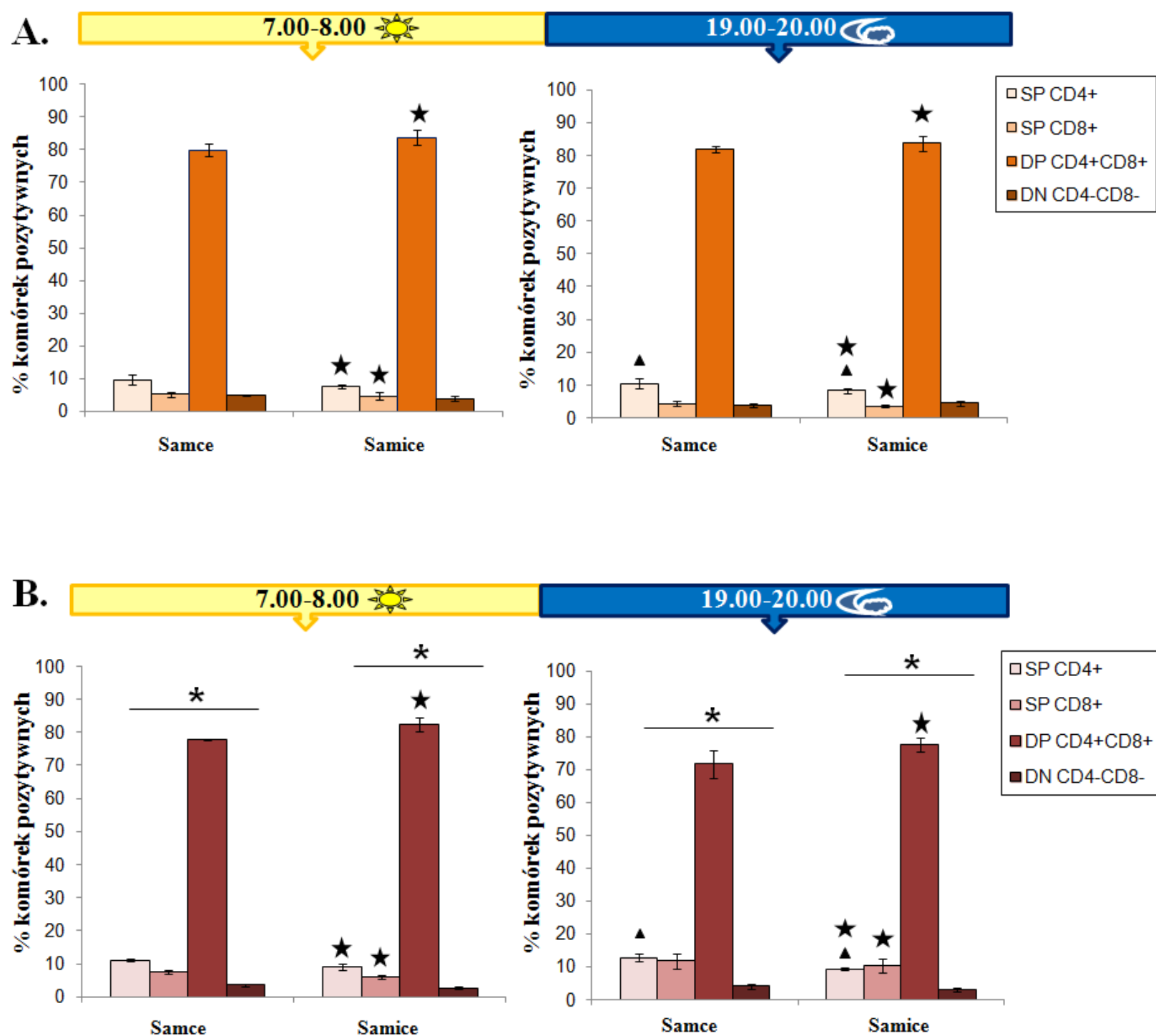
A – populacja tymocytów (bramka G1); **B** – rozkład głównych populacji tymocytów; **C** – rozkład tymocytów CD4+CD25- i CD4+CD25+ w populacji SP CD4+ (bramka G2 zaznaczona na cytogramie B) ; **D** – zawartość tymocytów Foxp3+ (nTreg) w populacji CD4+CD25+ (bramka G3 zaznaczona na cytogramie C). M1/M2 obszary analizy: M1 – tymocyty Foxp3- ; M2 – tymocyty Foxp3+

Analiza przeprowadzona w programie CellQuest.

5.1.1 Rozkład głównych populacji tymocytów w zależności od pory dnia

Analiza rozkładu głównych populacji tymocytów obu badanych szczepów myszy, C57BL/6 i BALB/c wskazuje na istotne statystycznie zmiany zależne od pory dnia (**Ryc. 11**). Przedstawione na rycinie wyniki wskazują również na zmiany w rozkładzie populacji tymocytów zależne od płci i szczepu myszy. Stwierdzono istotne statystycznie ($P < 0,01$) zwiększenie odsetka tymocytów SP CD4⁺ w grasicach obu szczepów myszy wieczorem. Sugeruje to przewagę rozwoju tymocytów w kierunku tej populacji komórek. Wykazano statystycznie istotne różnice w rozkładzie tymocytów zależne od płci, polegające na mniejszym odsetku tymocytów SP CD4⁺ ($P < 0,00001$) i SP CD8⁺ ($P < 0,001$) oraz większym odsetku tymocytów DP CD4⁺CD8⁺ ($P < 0,01$) u samic obu szczepów niezależnie od pory dnia. Zaobserwowano także, istotne statystycznie zmiany w rozkładzie głównych populacji tymocytów zależne od szczepu myszy: odsetek tymocytów SP CD4⁺ ($P < 0,002$) i SP CD8⁺ ($P < 0,001$) jest większy, natomiast odsetek tymocytów DP CD4⁺CD8⁺ ($P < 0,00001$) i DN ($P < 0,04$) jest mniejszy w grasicy myszy BALB/c.

Podsumowanie: wyniki badań wskazują na rytmiczność zmian w rozwoju tymocytów polegającą na ukierunkowaniu dojrzewania tymocytów w stronę populacji SP CD4⁺ wieczorem. Zaobserwowano różnice w rozwoju tymocytów zależne od płci. W grasicach samic występuje mniejszy odsetek tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺ oraz większy odsetek tymocytów DP CD4⁺CD8⁺. Wykazano także, różnice w rozwoju tymocytów w zależności od typu odpowiedzi immunologicznej. Myszy BALB/c charakteryzują się przewagą odsetka tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺.



Ryc. 11 Rozkład głównych populacji tymocytów w zależności od pory dnia

Odsetek tymocytów DN CD4-CD8-, DP CD4+CD8+, SP CD4+ i SP CD8+ samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str.54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:

* $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

5.1.2 Rozkład naturalnych regulatorowych limfocytów T w zależności od pory dnia

Wśród tymocytów SP CD4⁺ wyróżnia się populację tymocytów CD4⁺CD25⁺ zawierającą różne stadia rozwojowe nTreg. Stwierdzono istotne statystycznie zwiększenie odsetka tymocytów CD4⁺CD25⁺ ($P < 0,05$) wieczorem w grasicy myszy szczepu C57BL/6. Takiej zależności nie wykazano w przypadku myszy BALB/c (**Ryc. 12**). W obu szczepach myszy zaobserwowano różnice istotne statystycznie zależne od płci. Samice, niezależnie od pory dnia, charakteryzują się większym odsetkiem tymocytów CD4⁺CD25⁺ ($P < 0,02$), co szczególnie widoczne jest w przypadku szczepu C57BL/6. Odnotowano istotne statystycznie różnice w odsetku tymocytów CD4⁺CD25⁺ zależne od szczepu myszy: większy odsetek tych komórek występuje w grasicy myszy BALB/c ($P < 0,004$) niezależnie od pory dnia.

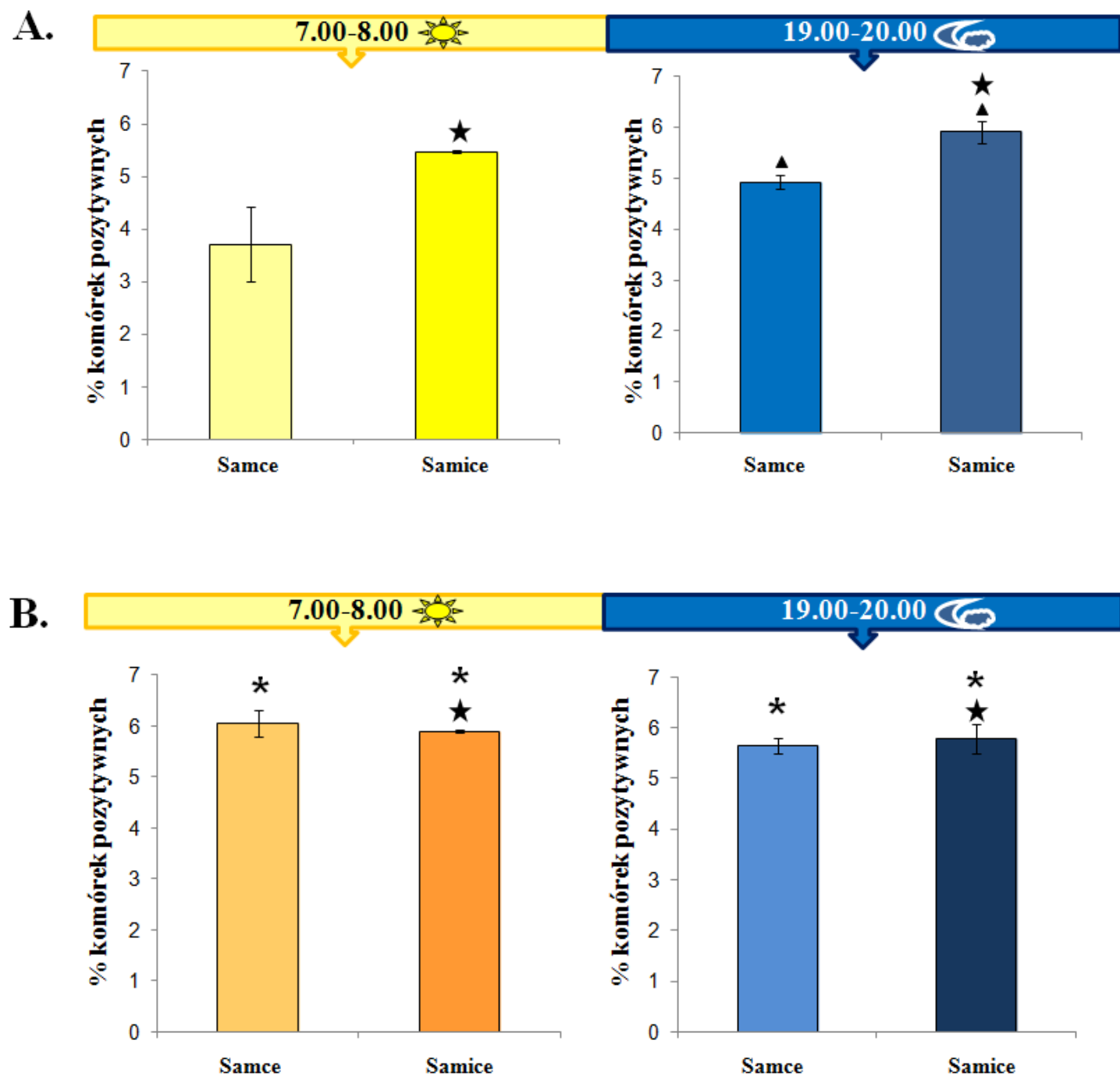
Wśród tymocytów CD4⁺CD25⁺ wyróżnia się odrębne populacje różniące się ekspresją CD25: CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high}. Powszechnie uważa się, że reprezentują one kolejne stadia rozwojowe nTreg, które różnią się zawartością komórek Foxp3-pozytywnych (Foxp3⁺) i ekspresją tego czynnika transkrypcyjnego (schemat analizy tymocytów CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high} w zależności od ekspresji CD25 i Foxp3 przedstawiono na **rycinie 2**, str. 25). Wykazano, istotne statystycznie zwiększenie odsetka tymocytów Foxp3-pozytywnych w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,000001$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,04$) wieczorem w grasicach obu szczepów myszy niezależnie od płci (**Ryc. 13**). Stwierdzono również istotne różnice w odsetku tymocytów Foxp3⁺ w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,0001$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,002$) w zależności od płci: w grasicach samic odsetek tymocytów Foxp3⁺ jest mniejszy niezależnie od pory dnia. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice w odsetku tymocytów Foxp3⁺ zależne od szczepu myszy: zarówno w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,003$) jak i w CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,000001$) odsetek tymocytów Foxp3⁺ jest większy w grasicy myszy szczepu BALB/c.

Porównano także zmiany ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w populacjach CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high} (**Ryc. 14**). W przypadku ekspresji Foxp3 w tymocytach CD4⁺CD25^{low} nie stwierdzono żadnych zmian w zależności od pory dnia w obu szczepach myszy niezależnie od płci. Statystycznie istotne zwiększenie ekspresji czynnika Foxp3 zaobserwowano natomiast wieczorem w tymocytach CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,0001$) w obu szczepach myszy niezależnie od płci. Odnotowano także, istotne różnice w ekspresji Foxp3 pomiędzy szczepami myszy C57BL/6 i BALB/c. Ekspresja Foxp3 w grasicach

myszy BALB/c jest większa w tymocytach CD4+CD25^{low} ($P<0,003$), natomiast w tymocytach CD4+CD25^{high} mniejsza ($P<0,00001$).

Określono odsetek dojrzałych nTreg CD4+CD25+Foxp3+ w grasicach myszy C57BL/6 i BALB/c obu płci (**Ryc. 15**). Odnótowano statystycznie istotne zwiększenie odsetka nTreg ($P<0,000001$) wieczorem w obu szczepach myszy niezależnie od płci. Stwierdzono także, że w obu szczepach myszy, mniejszy odsetek nTreg ($P<0,0002$) występuje u samic niezależnie od pory dnia.

Podsumowanie: wyniki badań wskazują na rytmiczność rozwoju nTreg. Niezależnie od płci i szczepu myszy zwiększenie odsetka tymocytów Foxp3+ zarówno w populacji populacji CD4+CD25^{low} jak i CD4+CD25^{high} występuje wieczorem. Ponadto, również wieczorem ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w tymocytach CD4+CD25^{high} jest większa niezależnie od płci i szczepu myszy. Zmiany w rozwoju nTreg korelują ze zwiększeniem odsetka dojrzałych nTreg CD4+CD25+Foxp3+ wieczorem niezależnie od płci i szczepu myszy.



Ryc. 12 Odsetek tymocytów CD4+CD25+ w populacji SP CD4+ w zależności od pory dnia

Odsetek tymocytów CD4+CD25+ w populacji SP CD4+ samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

Analiza statystyczna (patrz str.54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:
(test t-Studenta)

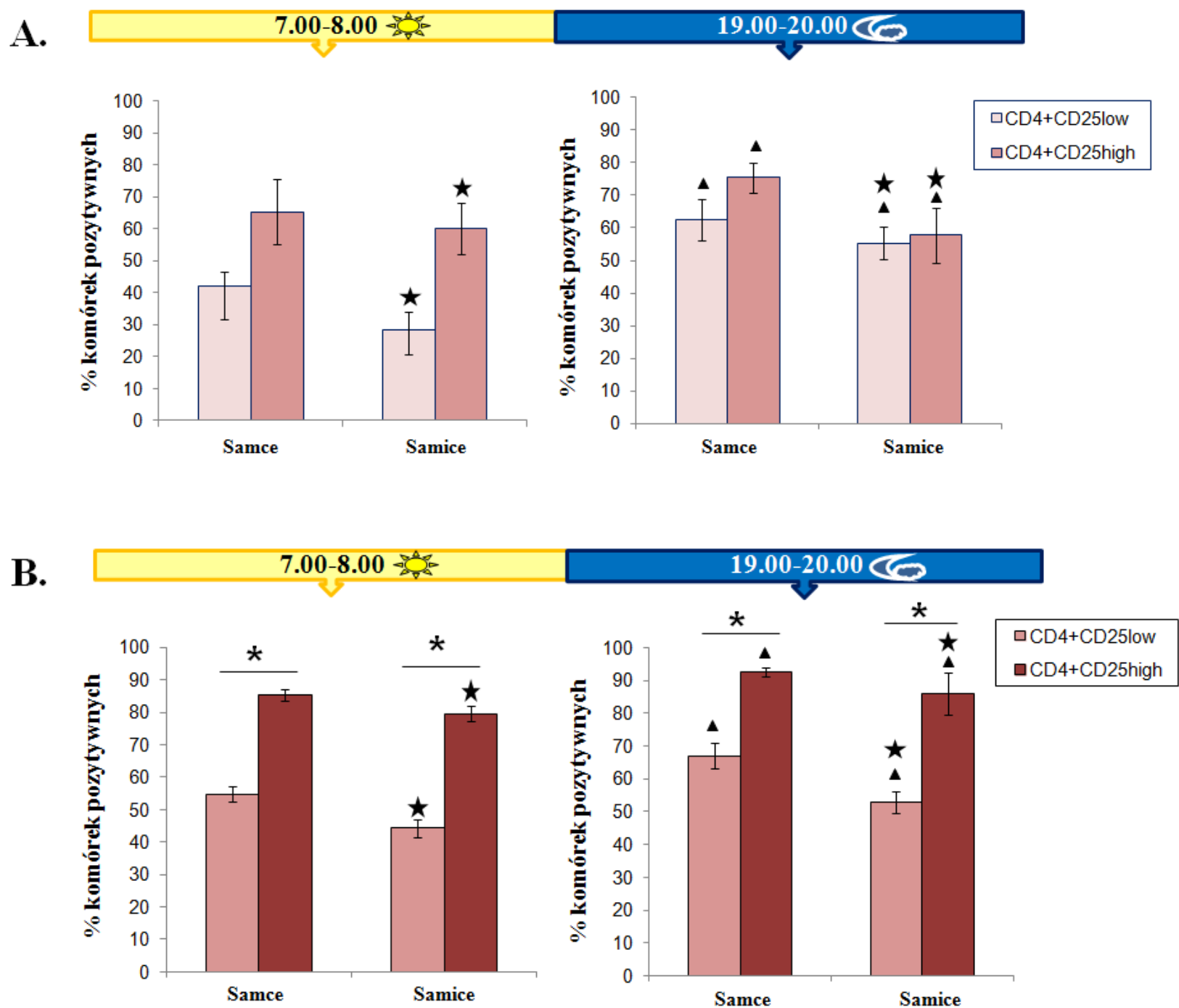
▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:
(trzy-czynnikowa ANOVA)

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:
(trzy-czynnikowa ANOVA)

* $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c



Ryc. 13 Odsetek tymocytów Foxp3+ w populacji CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} w zależności od pory dnia

Odsetek tymocytów Foxp3+ w populacji tymocytów CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str.54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

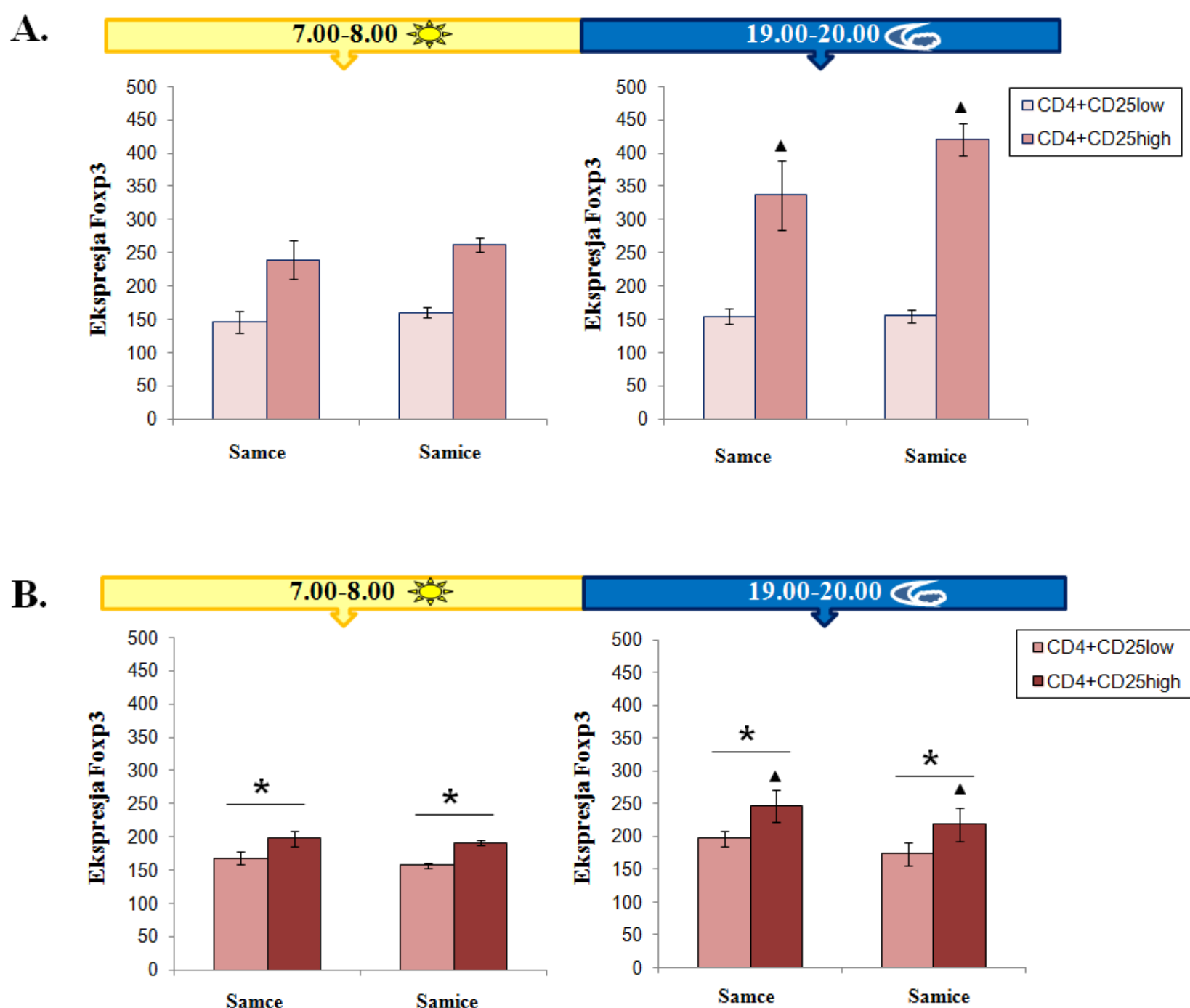
▲ p<0,05 samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:

★ p<0,05 samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:

* p<0,05 szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c



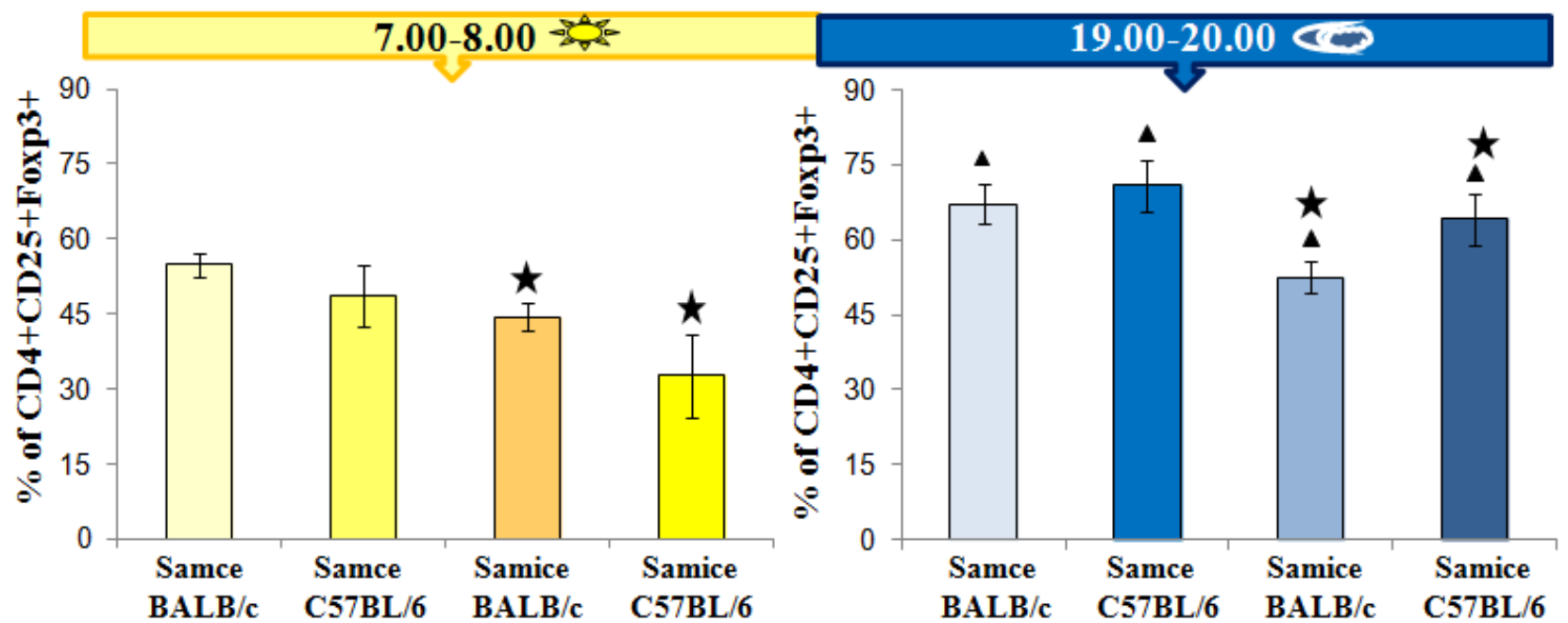
Ryc. 14 Ekspresja czynnika Fxp3 w zależności od pory dnia

Ekspresja Fxp3 w populacji tymocytów CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} samców i samic szczepu C57/BL6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem. Ekspresję Fxp3 oceniano na podstawie intensywności fluorescencji (FI – fluorescence intensity) pochodzącej od fluorochromu sprzężonego z przeciwciałem anti-Fxp3.

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str.54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: \blacktriangle $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy: * $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c



Ryc. 15 Odsetek dojrzałych tymocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3 w populacji CD4+CD25+ w zależności od pory dnia

Odsetek dojrzałych tymocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+ w populacji CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 oraz BALB/c rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str.54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

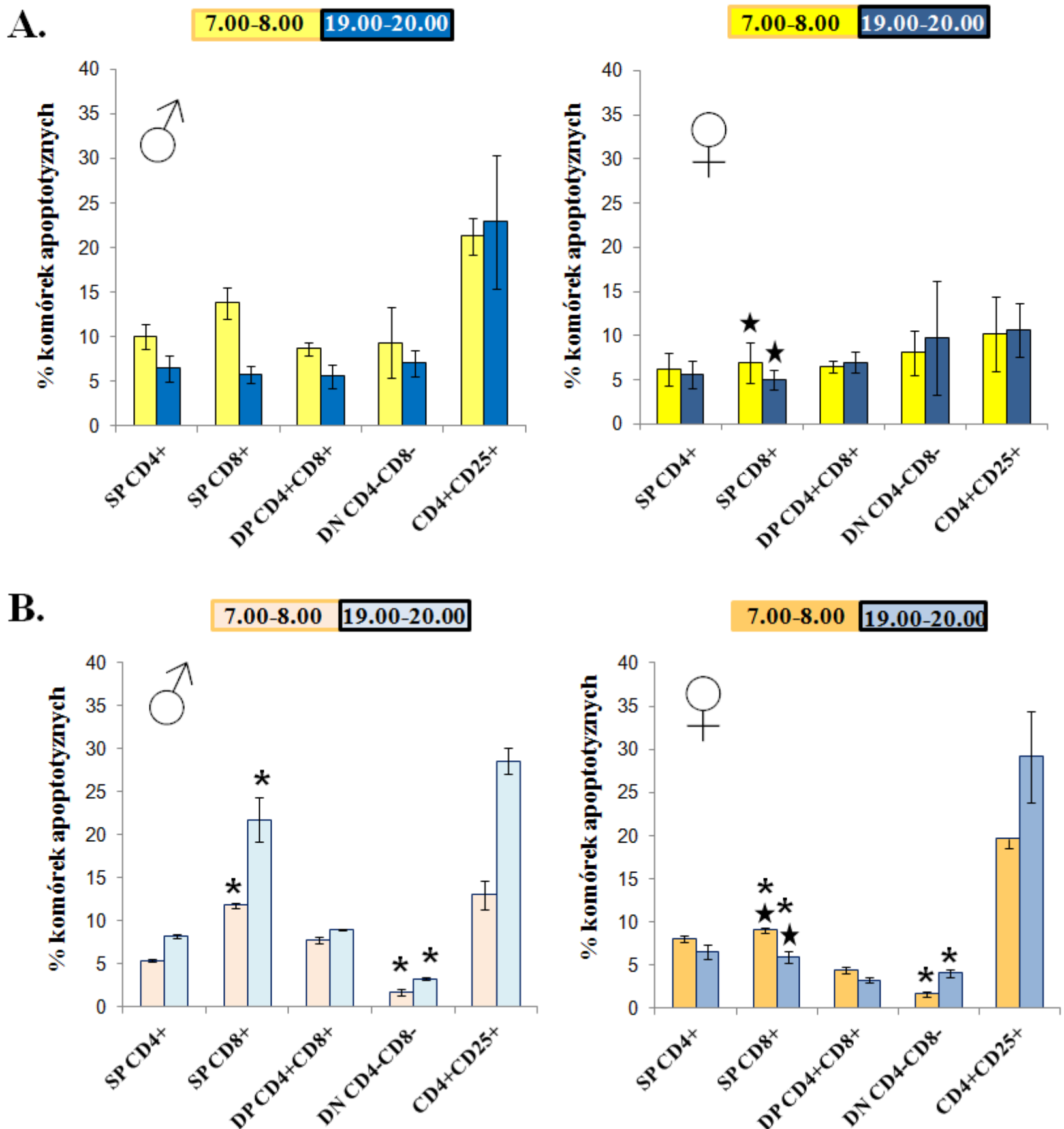
w zależności od płci:

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

5.1.3 Analiza poziomu apoptozy tymocytów w zależności od pory dnia

Zbadano, czy obserwowane zmiany kinetyki rozwoju głównych populacji tymocytów oraz nTreg nie są jedynie wynikiem zmian w poziomie apoptozy poszczególnych populacji tymocytów zależnych od pory dnia. Nie stwierdzono różnic w odsetku komórek apoptotycznych w głównych populacjach tymocytów i nTreg obu szczepów myszy zależnych od pory dnia i płci (**Ryc. 16**). Samice obu szczepów myszy charakteryzują się mniejszym odsetkiem komórek apoptotycznych w populacji SP CD8⁺ ($P < 0,004$). Wykazano istotne różnice w poziomie apoptozy niektórych populacji tymocytów pomiędzy szczepami C57BL/6 i BALB/c: u samców BALB/c odsetek komórek apoptotycznych w populacji SP CD8⁺ jest większy ($P < 0,0003$), natomiast w populacji DN mniejszy ($P < 0,0002$).

Podsumowanie: wyniki wskazują, że zmienność kinetyki rozwoju nTreg nie zależy od zmian poziomu apoptozy zależnych od pory dnia w badanych populacji tymocytów niezależnie od szczepu myszy i płci.



Ryc. 16 Poziom apoptozy tymocytów w zależności od pory dnia

Odsetek komórek apoptotycznych w populacjach tymocytów samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od płci:

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:

* $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

5.1.4 Aktywność supresorowa nTreg w zależności od pory dnia

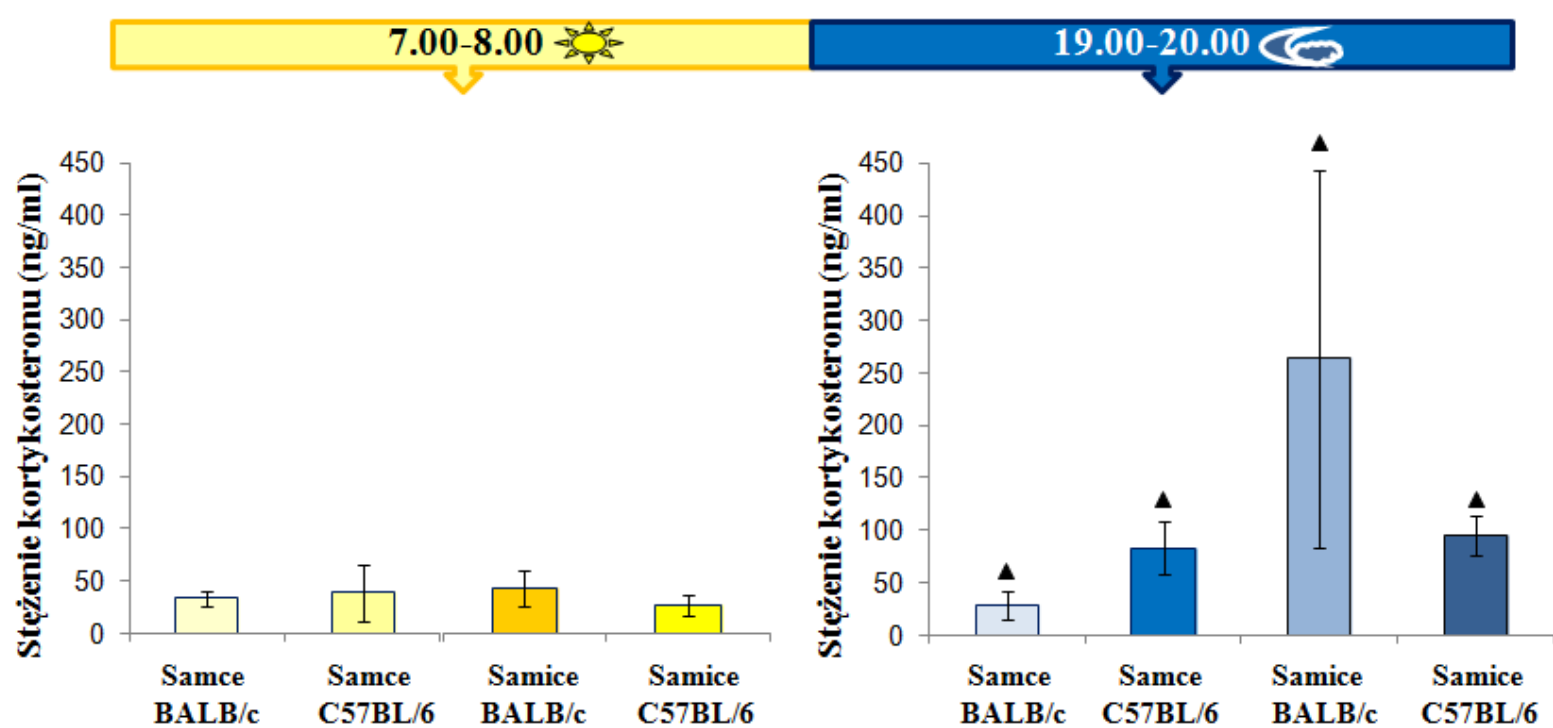
Porównano poziom proliferacji limfocytów T węzłów chłonnych aktywowanych przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28 w 72-godzinnej hodowli *in vitro* przy braku oraz w obecności izolowanych z grasic nTreg. Eksperyment przeprowadzono z wykorzystaniem jedynie myszy szczepu C57BL/6. Wykazano istotne statystycznie zahamowanie proliferacji aktywowanych limfocytów T CD4⁺ w obecności nTreg (**Ryc. 17**). Zmniejszenie poziomu proliferacji limfocytów T CD4⁺ wykazuje zależność od pory dnia i jest istotnie większe wieczorem ($P < 0,05$) (**Ryc. 17A i B**). Wykazano istotne statystycznie zwiększenie aktywności supresorowej nTreg, mierzone % hamowania proliferacji limfocytów T CD4⁺ w porównaniu z kontrolą, wieczorem ($P < 0,03$). Aktywność supresorowa nTreg samców jest większa zarówno rano jak i wieczorem ($P < 0,04$). Natomiast różnica aktywności supresorowej nTreg między wyznaczonymi punktami czasowymi jest większa u samic. (**Ryc. 17C**).

Podsumowanie: wykazano rytmiczność zmian aktywności supresorowej nTreg w zależności od pory dnia. Wykazano również różnice aktywności supresorowej nTreg zależne od płci.

5.1.5 Stężenie kortykosteronu w zależności od pory dnia

Zbadano zmiany poziomu endogennych glukokortykoidów w osoczu rano i wieczorem. Statystycznie istotne zwiększenie stężenia kortykosteronu wieczorem zanotowano w osoczu obu szczepów myszy niezależnie od płci (**Ryc. 18**). Nie wykazano różnic zależnych od szczepu myszy.

Podsumowanie: stężenie endogennych glukokortykoidów w osoczu jest większe wieczorem niezależnie od płci i szczepu.



Ryc. 18 Stężenie kortykosteronu w osoczu w zależności od pory dnia

Stężenie kortykosteronu w osoczu samców i samic szczepu C57BL/6 i BALB/c rano i wieczorem. Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

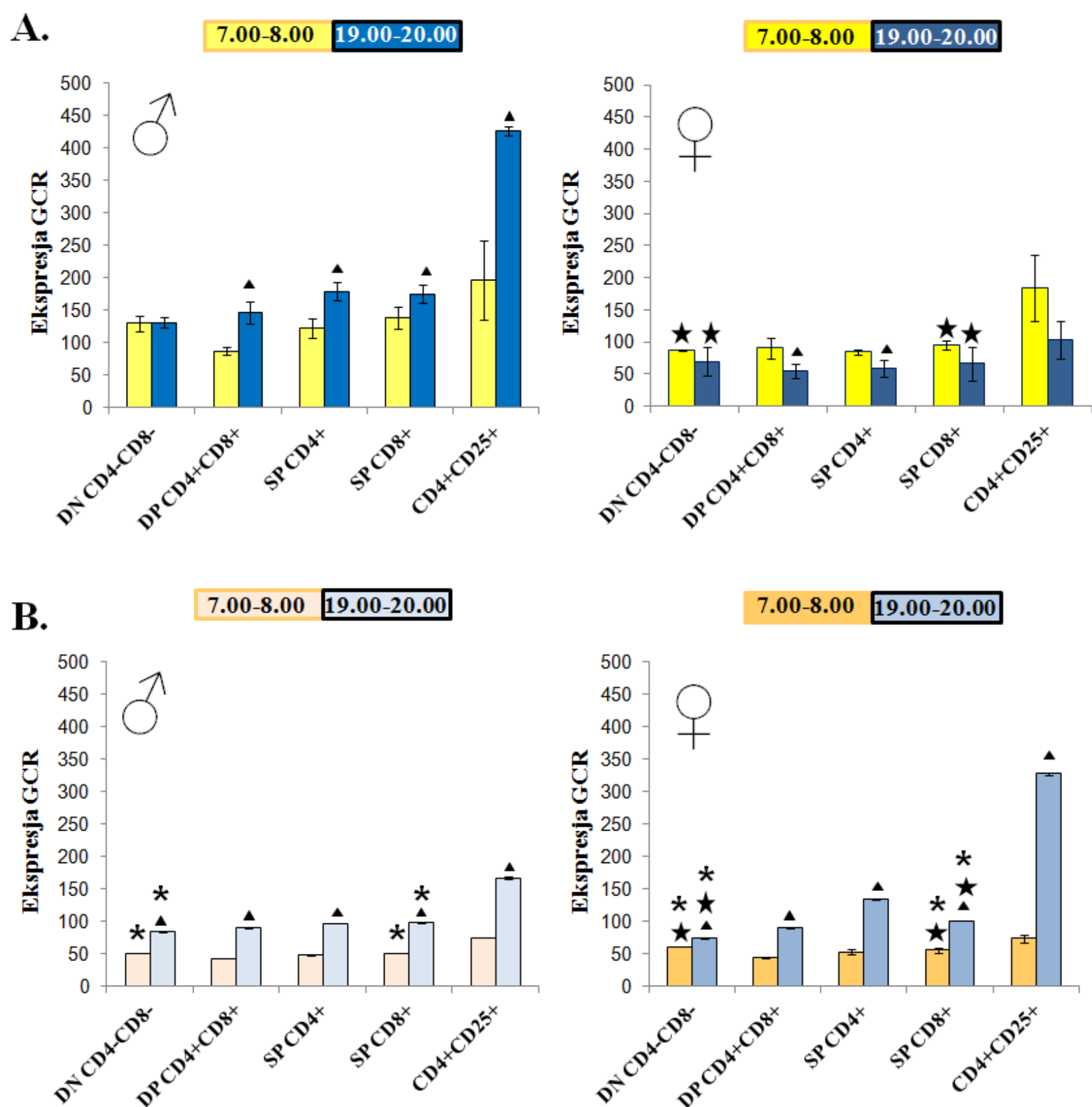
w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

5.1.6 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach w zależności od pory dnia

Zbadano, czy obserwowane zmiany kinetyki rozwoju głównych populacji tymocytów oraz nTreg korelują z ekspresją receptorów dla glukokortykoidów. Zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie ekspresji GCR w badanych populacjach tymocytów wieczorem w grasicach myszy BALB/c niezależnie od płci i samców myszy C57BL/6 ($P<0,05$) (**Ryc. 19**). W zależności od płci zaobserwowano istotne różnice w ekspresji GCR w populacji DN ($P<0,02$) i SP CD8+ ($P<0,03$). W porównianiu do samców, niezależnie od pory dnia ekspresja GCR u samic C57BL/6 jest mniejsza natomiast u samic BALB/c większa. Analiza ekspresji receptorów dla GC myszy pomiędzy szczepami myszy C57BL/6 i BALB/c wskazuje na istotne zmiany w populacji DN ($P<0,03$) i SP CD8+ ($P<0,004$). Wykazano mniejszą ekspresję GCR w populacji DN i SP CD8+ samców BALB/c niezależnie od pory dnia oraz u samic BALB/c rano. Wieczorem samice BALB/c charakteryzują się większą ekspresją GCR w populacji DN i SP CD8+.

Podsumowanie: ekspresja receptorów dla GC w tymocytach wykazuje rytmiczność zależną od pory dnia i jest większa wieczorem niezależnie od szczepu myszy. Zależność taka nie jest zachowana jedynie w tymocytach samic C57BL/6.



Ryc. 19 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach w zależności od pory dnia

Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach samców i samic szczepu C57BL/6 (A) i BALB/c (B) rano i wieczorem.

Analiza statystyczna (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:
(test t-Studenta)

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:
(trzy-czynnikowa ANOVA)

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:
(trzy-czynnikowa ANOVA)

* $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

5.2 Wpływ deksametazonu na rozwój głównych populacji tymocytów i naturalnych regulatorowych limfocytów T

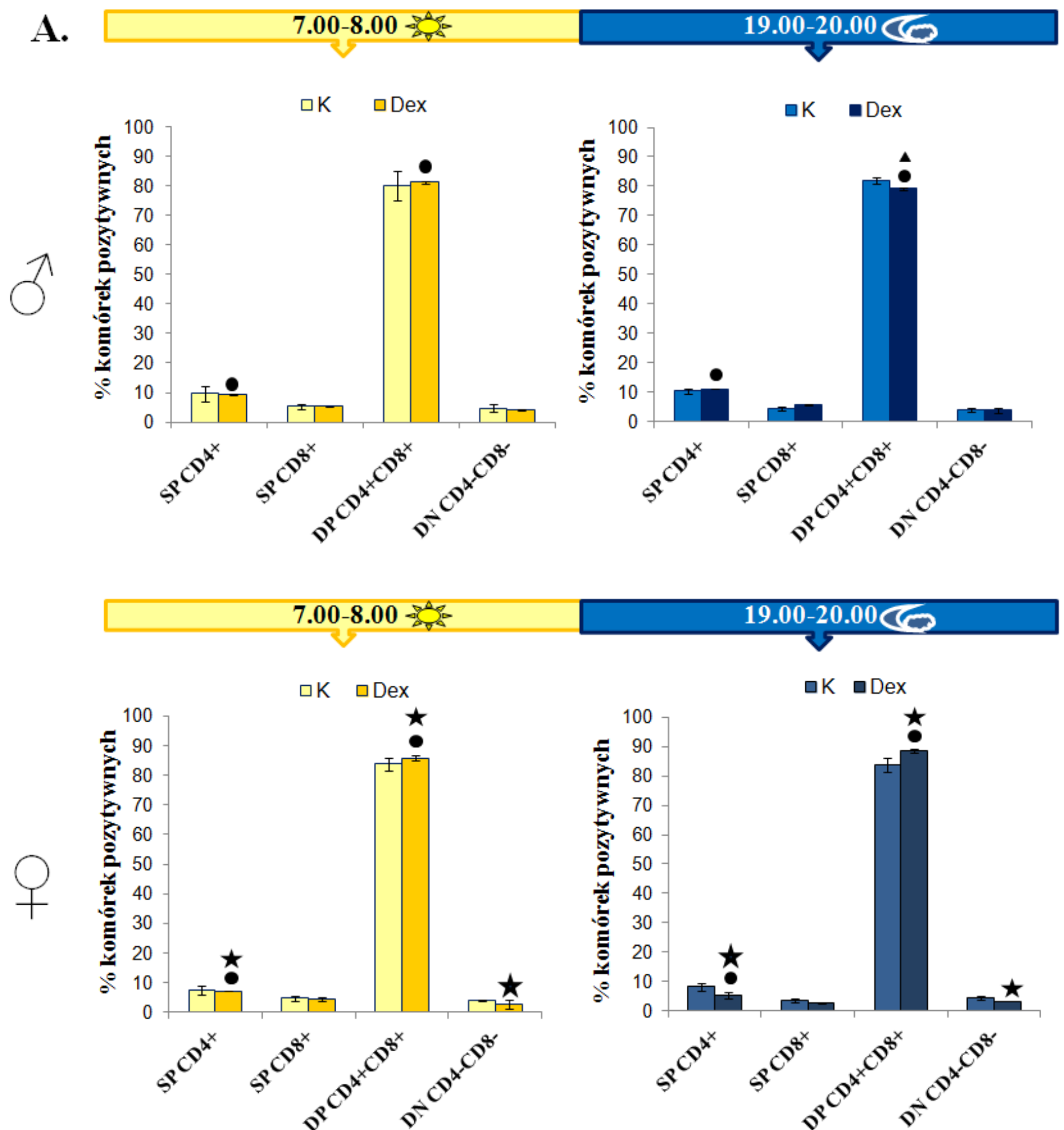
Celem drugiej części pracy była weryfikacja hipotezy zakładającej udział glukokortykoidów w regulacji rozwoju i aktywności supresorowej nTreg. W tej części eksperymentów myszy traktowano syntetycznym glukokortykoidem – deksametazonem przez dootrzewnowe wstrzyknięcie dwóch wybranych dawek: 1.25 $\mu\text{g/kg/dobę}$ i 1.25 mg/kg/dobę . Ze względu na brak istotnych różnic w odsetku i aktywności limfocytów nTreg po podaniu myszom mniejszej dawki Dex – 1.25 $\mu\text{g/kg/dobę}$, w rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki eksperymentów z wykorzystaniem myszy traktowanych większą dawką Dex (1.25 mg/kg/dobę).

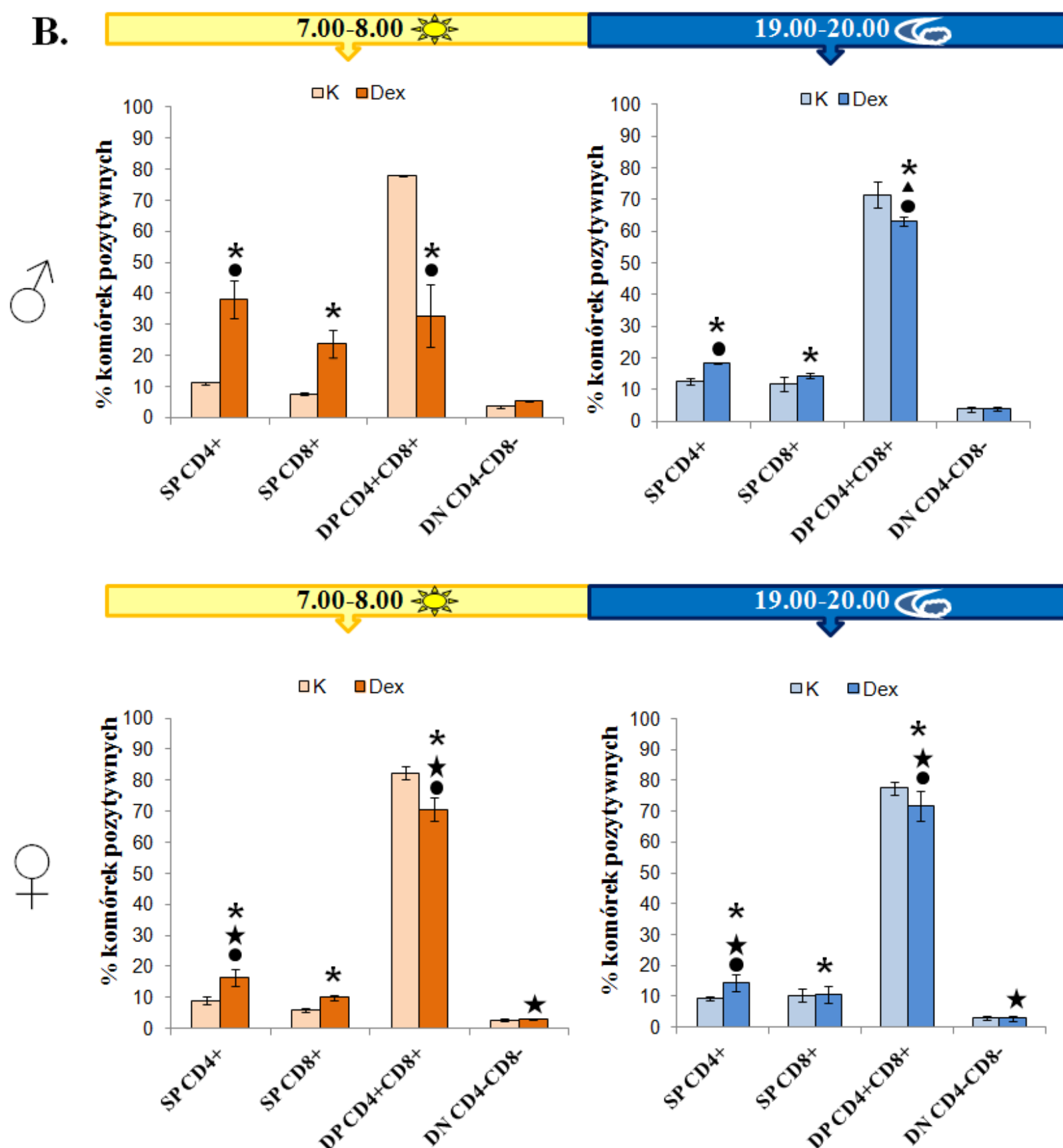
5.2.1 Wpływ deksametazonu na rozkład głównych populacji tymocytów

Analiza rozkładu głównych populacji tymocytów rano i wieczorem po podaniu Dex wskazuje na istotne statystycznie zmiany w odsetku SP CD4⁺ ($P < 0,002$) i DP ($P < 0,003$) w grasicach obu szczepów myszy (**Ryc. 20**). Wykazano zmniejszenie odsetka tymocytów SP CD4⁺ oraz zwiększenie odsetka SP CD8⁺ w grasicach myszy C57BL/6. W przypadku szczepu BALB/c odnotowano, że traktowanie Dex spowodowało zwiększenie odsetka SP CD4⁺ i SP CD8⁺, co wskazuje na przesunięcie rozwoju tymocytów w kierunku populacji SP CD4⁺. Nie wykazano istotnie statystycznych różnic w odsetku SP CD4⁺ zależnych od pory dnia w grasicach obu szczepów myszy traktowanych deksametazonem. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w odsetku SP CD4⁺ i DP w zależności od płci: traktowanie myszy Dex spowodowało zmniejszenie odsetka SP CD4⁺ ($P < 0,002$) oraz zwiększenie odsetka DP ($P < 0,003$) w grasicach samic niezależnie od szczepu myszy. Stwierdzono także, istotne statystycznie zmiany w rozkładzie głównych populacji tymocytów zależne od szczepu: w grasicach myszy BALB/c traktowanych Dex zwiększa się odsetek tymocytów SP CD4⁺ ($P < 0,0001$) i SP CD8⁺ ($P < 0,00001$) oraz zmniejsza odsetek tymocytów DP ($P < 0,003$).

Podsumowanie: traktowanie myszy deksametazonem zmienia rytmiczność rozkładu tymocytów obserwowaną w warunkach fizjologicznych (patrz. podsumowanie str. 57). W grasicach myszy BALB/c traktowanych Dex widoczne jest przekierowanie rozwoju tymocytów w stronę populacji SP CD4⁺ niezależnie od pory dnia, w przeciwieństwie do

myszy C57BL/6, w których obserwuje się zahamowanie rozwoju tymocytów SP CD4+. Zaobserwowano także, wpływ Dex na kinetykę rozwoju tymocytów zależną od płci: charakteryzującą się zmniejszeniem odsetka tymocytów SP CD4+ i zwiększeniem odsetkiem tymocytów DP u samic obu szczepów myszy niezależnie od pory dnia oraz od typu odpowiedzi immunologicznej: przejawiającą się zwiększeniem odsetka dojrzałych tymocytów SP CD4+ i SP CD8+ myszy BALB/c.





Ryc. 20 Rozkład głównych populacji tymocytów w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

Odsetek tymocytów DN CD4-CD8-, DP CD4+CD8+, SP CD4+ i SP CD8+ samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: ▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
(test t-Studenta)

w zależności od płci: ★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór
(cztero-czynnikowa ANOVA)

w zależności od szczepu myszy: * $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c
(cztero-czynnikowa ANOVA)

w zależności od podania Dex: ● $P < 0,05$ kontrola vs Dex
(cztero-czynnikowa ANOVA)

5.2.2 Wpływ deksametazonu na rozkład naturalnych regulatorowych limfocytów T

W populacji tymocytów SP CD4⁺ określono odsetek tymocytów CD4⁺CD25⁺. Po podaniu Dex, wykazano istotne statystycznie zwiększenie odsetka tymocytów CD4⁺CD25⁺ niezależnie od pory dnia w grasicach obu szczepów myszy (z wyjątkiem samic myszy C57BL/6) ($P < 0,03$) (**Ryc. 21**). Stwierdzono także, po podaniu Dex, istotne statystycznie różnice w odsetku tymocytów CD4⁺CD25⁺ zależne od szczepu: myszy BALB/c charakteryzują się większym odsetkiem komórek o tym fenotypie, co szczególnie widoczne jest w grasicach samców ($P < 0,0002$).

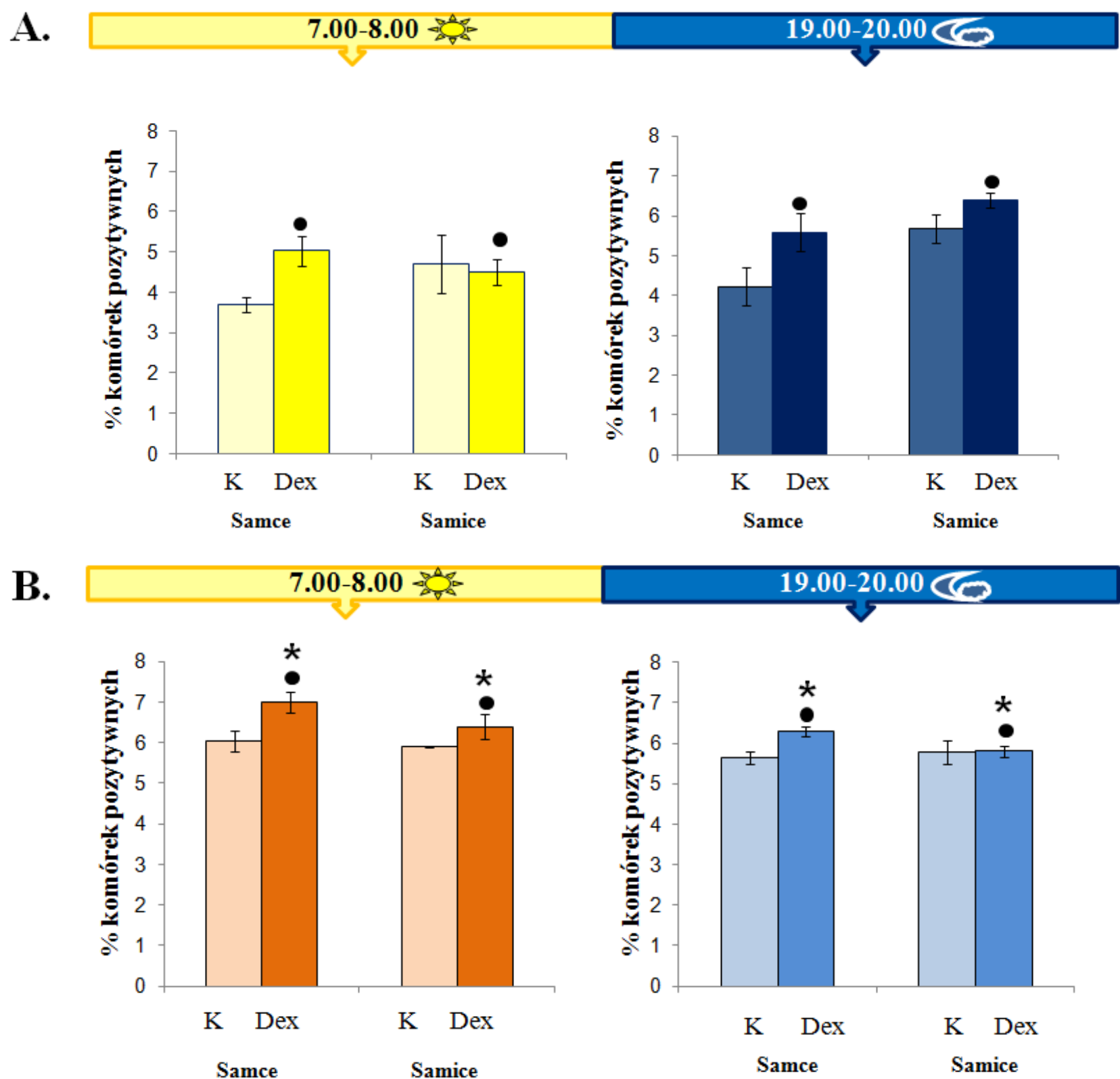
Zanalizowano wpływ deksametazonu na odsetek tymocytów Foxp3⁺ w kolejnych stadiach rozwojowych nTreg w populacji CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high} (**Ryc. 22**). Traktowanie myszy deksametazonem spowodowało istotne statystycznie zwiększenie odsetka tymocytów Foxp3⁺ w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,003$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,0001$) w obu szczepach myszy (z wyjątkiem samic C57BL/6). Odsetek tymocytów Foxp3 zarówno w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,000001$) jak i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,0001$) jest większy wieczorem w obu szczepach myszy, z wyjątkiem samców C57BL/6. W grasicach samic obu szczepów myszy traktowanych Dex stwierdzono mniejszy odsetek tymocytów Foxp3⁺ w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,000001$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,0001$) w porównaniu z grasicami samców. Wykazano także, istotne statystycznie różnice w odsetku tymocytów Foxp3⁺ zależne od szczepu myszy: większy odsetek tych komórek stwierdzono zarówno w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,000003$) jak i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,000001$) myszy BALB/c niezależnie od płci i pory dnia.

Wykazano zmiany ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w tymocytach CD4⁺CD25^{low} i CD4⁺CD25^{high} myszy traktowanych deksametazonem (**Ryc. 23**). Wieczorem w obu szczepach myszy ekspresja Foxp3 w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,0003$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,000001$) jest istotnie większa niezależnie od płci. Stwierdzono istotne statystycznie różnice ekspresji Foxp3 w populacji CD4⁺CD25^{low} ($P < 0,0001$) i CD4⁺CD25^{high} ($P < 0,000001$) zależne od szczepu: w myszach BALB/c ekspresja Foxp3 w tymocytach CD4⁺CD25^{high} jest mniejsza niezależnie od pory dnia, natomiast w tymocytach CD4⁺CD25^{low} rano jest mniejsza a wieczorem większa w porównaniu z szczepem C57BL/6.

Odsetek dojrzałych nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ myszy traktowanych deksametazonem przedstawiono na **rycinie 24**. W porównaniu z kontrolą wykazano zwiększenie odsetka

nTreg w grasicach obu szczepów myszy ($P < 0,000001$). Zanotowano zmiany odsetka nTreg w grasicach myszy traktowanych Dex zależne od pory dnia: odsetek tych komórek był większy wieczorem ($P < 0,000001$). Niezależnie od pory dnia, samice obu szczepów charakteryzują się mniejszym odsetkiem nTreg ($P < 0,000001$). Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w odsetku nTreg zależnych od szczepu myszy traktowanych deksametazonem.

Podsumowanie: deksametazon powoduje zwiększenie odsetka tymocytów CD4+CD25+ w obu szczepach myszy niezależnie od pory dnia. Traktowanie myszy Dex skutkuje zwiększeniem odsetka tymocytów Foxp3+ zarówno w populacji CD4+CD25^{low} jak i CD4+CD25^{high}, przy czym zachowana zostaje rytmiczność rozkładu tymocytów Foxp3+ w zależności od pory dnia jak w przypadku warunków fizjologicznych. Ekspresję Foxp3 również charakteryzuje rytmiczność zależna od pory dnia, jednakże zastosowana dawka Dex nie indukowała wzrostu ekspresji Foxp3 w porównaniu z kontrolą o tej samej porze dnia.



Ryc. 21 Odsetek tymocytów CD4+CD25+ w populacji SP CD4+ w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

Odsetek tymocytów CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

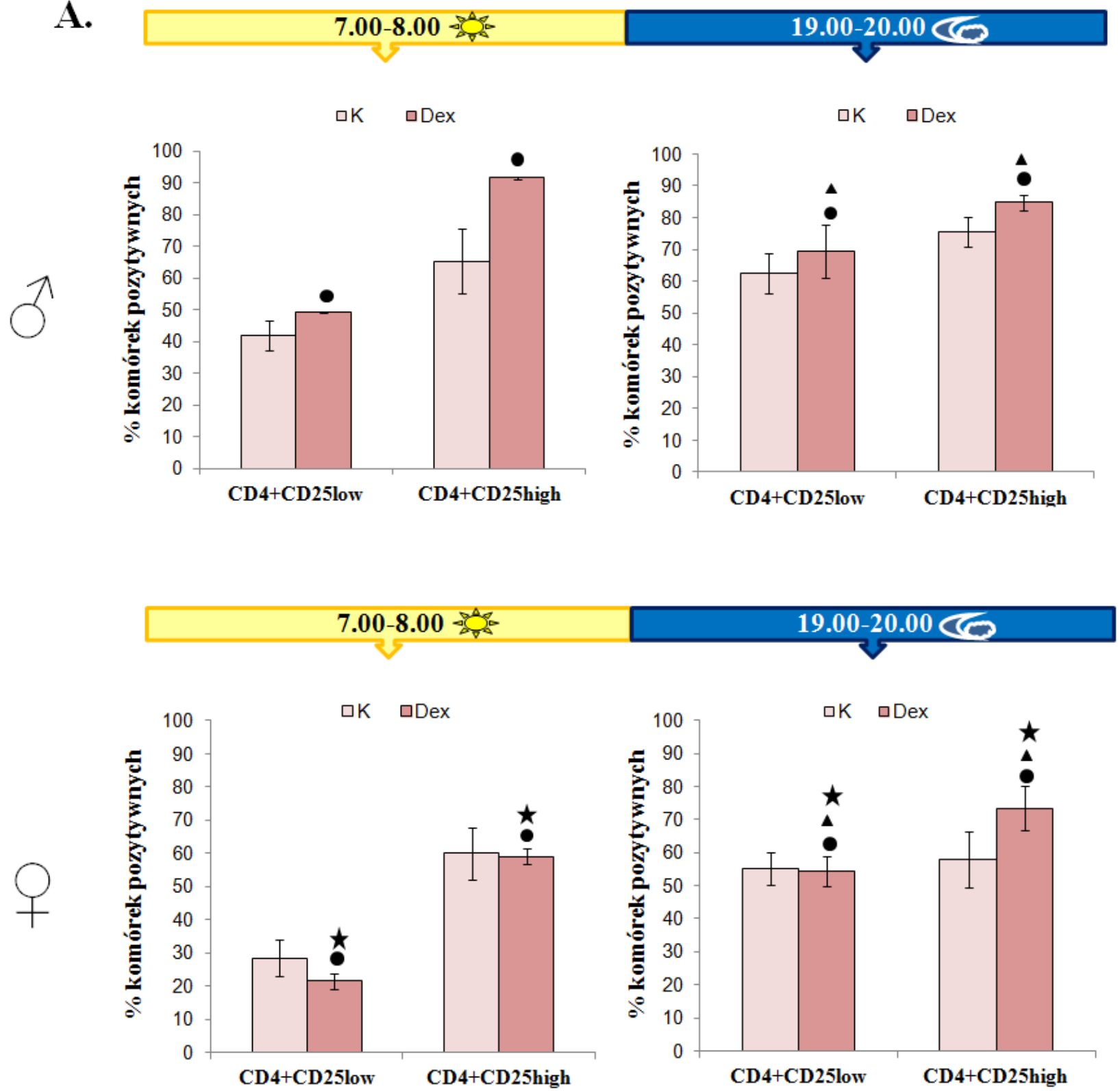
K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

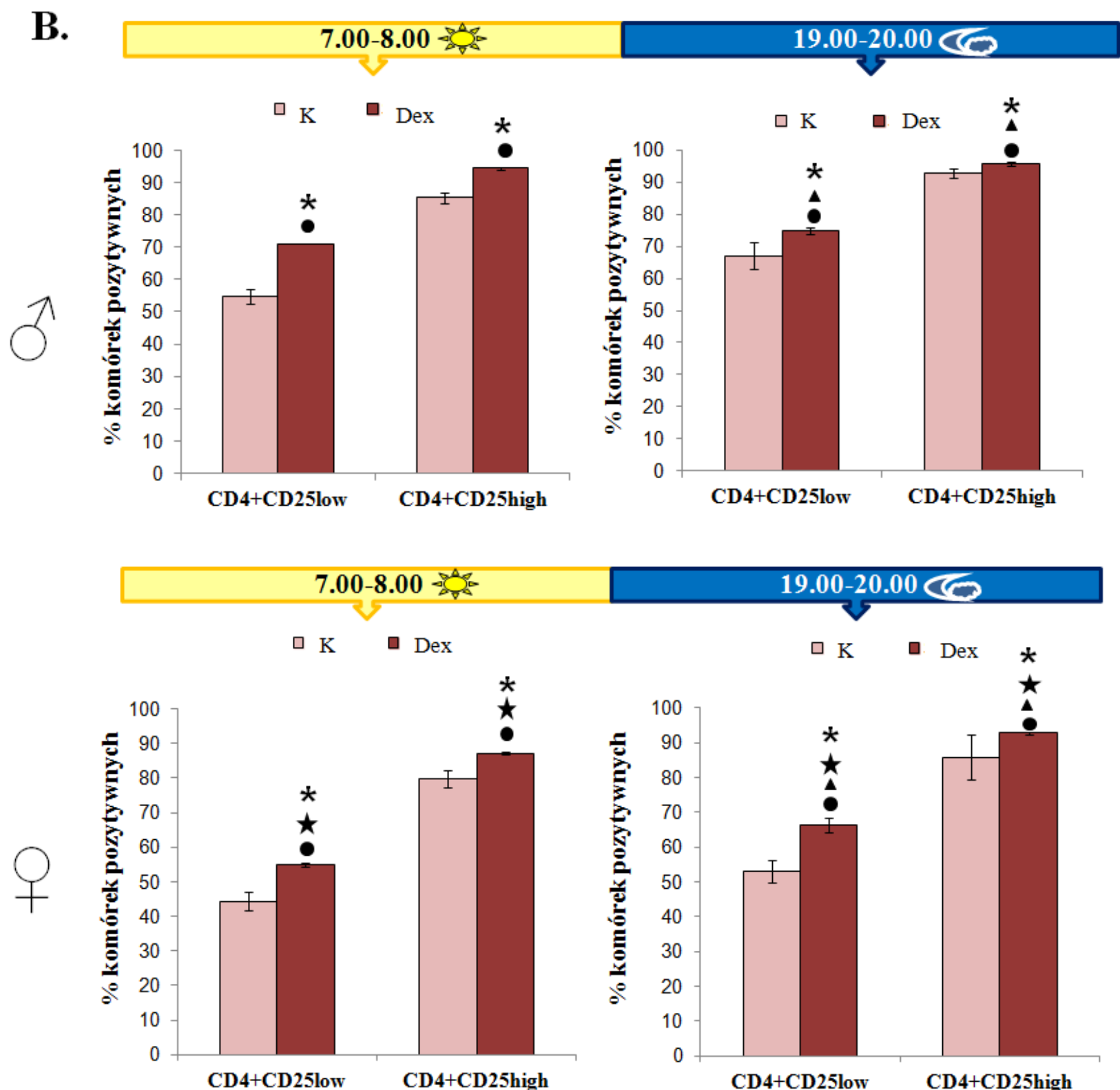
Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od szczepu myszy: * $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

w zależności od podania Dex: ● $P < 0,05$ kontrola vs Dex

A.





Ryc. 22 Odsetek tymocytów Foxp3⁺ w populacji CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

Odsetek tymocytów Foxp3⁺ w populacji CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} samców i samic szczepu C57BL/6 (A) i BALB/c (B) rano i wieczorem.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ p<0,05 samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:

★ p<0,05 samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

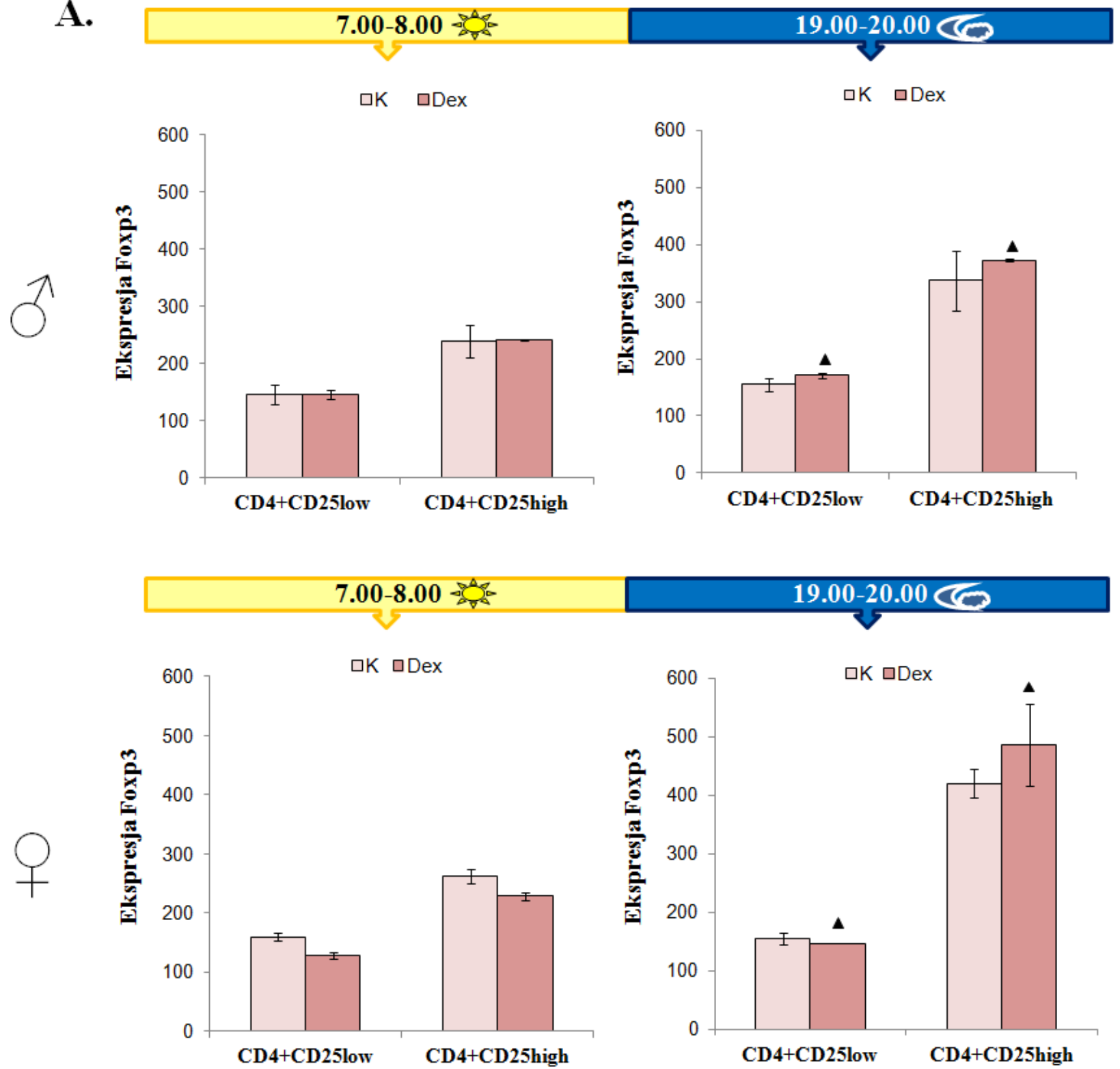
w zależności od szczepu myszy:

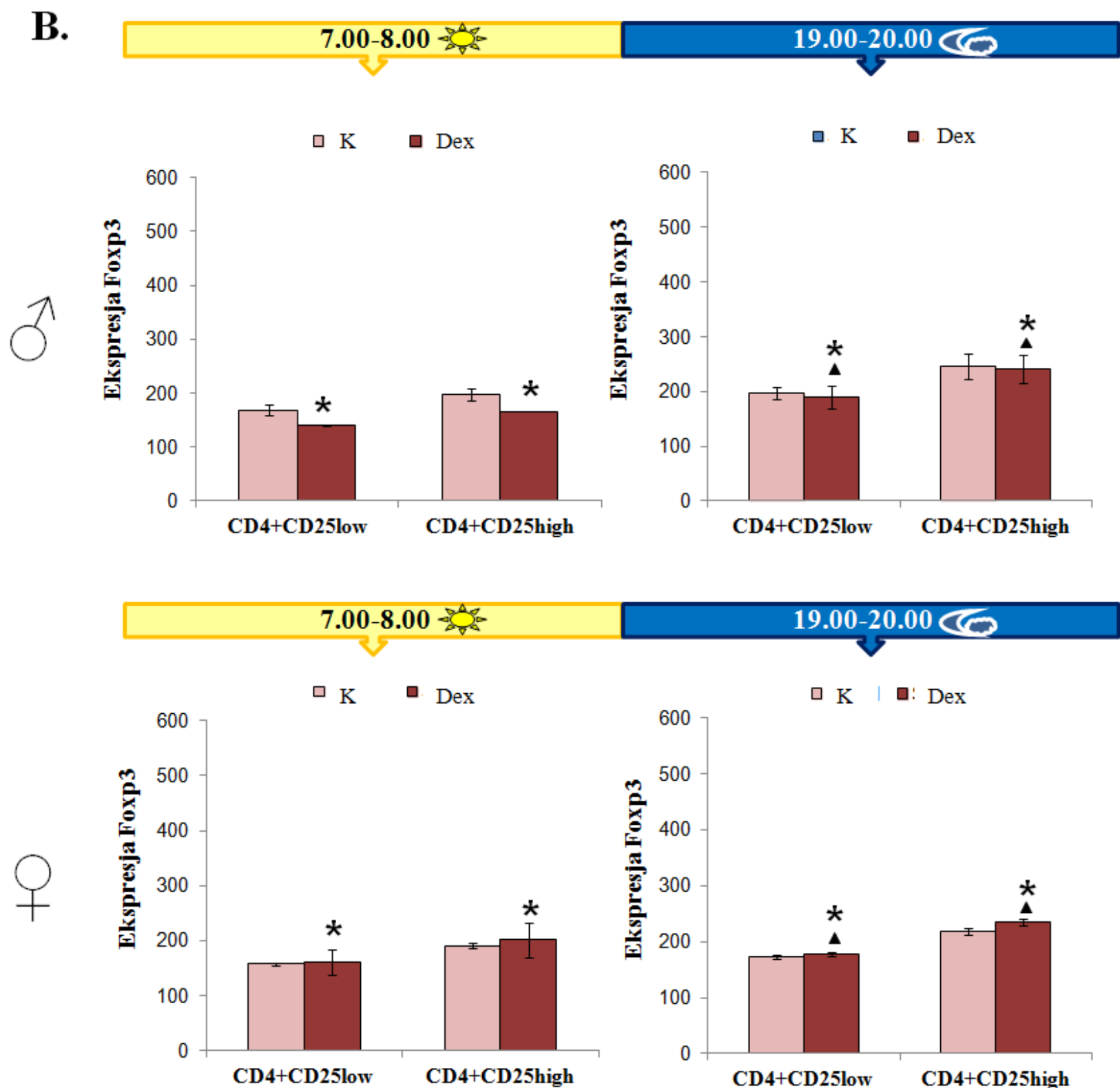
* p<0,05 szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

w zależności od podania Dex:

● P<0,05 kontrola vs Dex

A.





Ryc. 23 Ekspresja Foxp3 w populacji CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

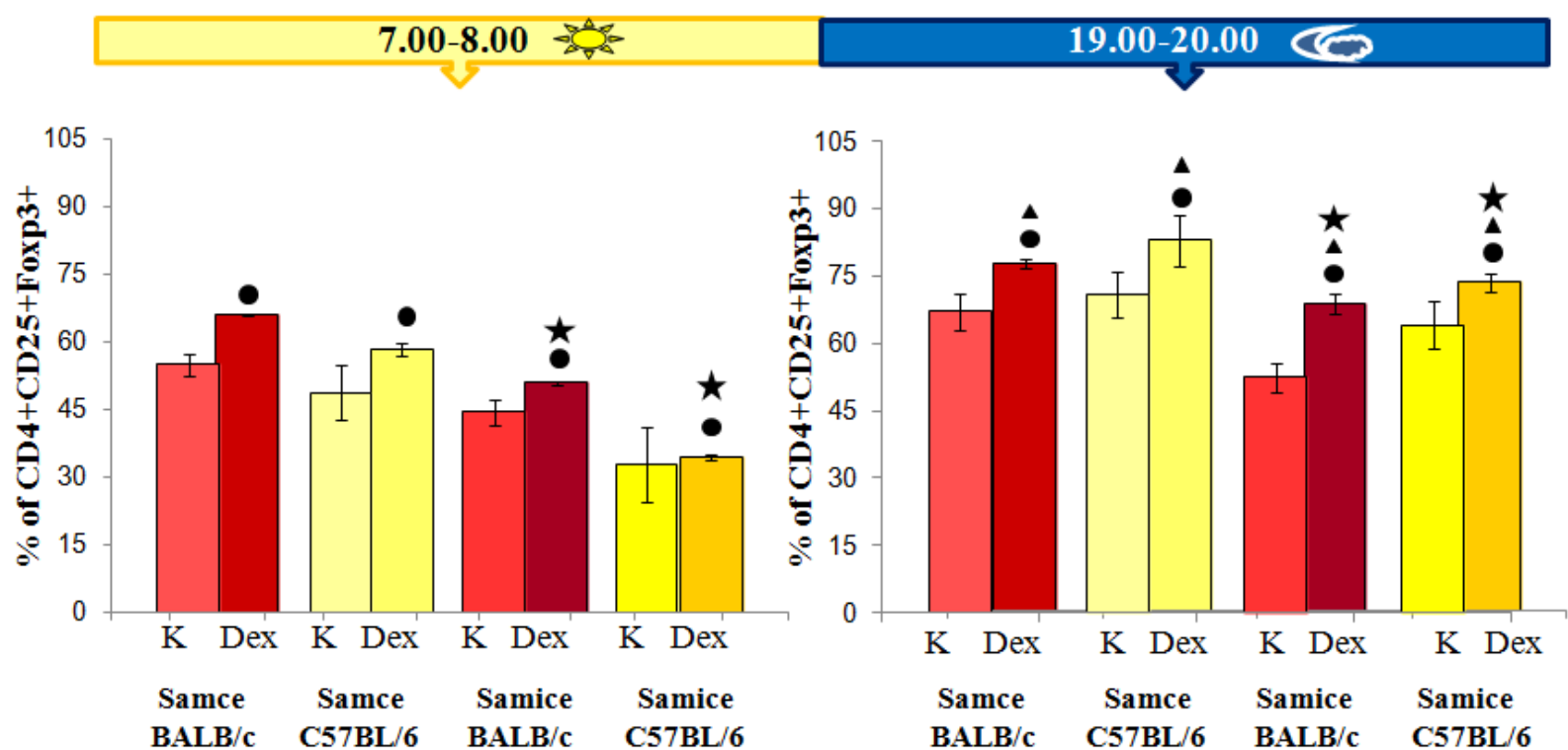
Ekspresja Foxp3 w populacji tymocytów CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high} samców i samic szczepu C57BL/6 (A) i BALB/c (B) rano i wieczorem. Ekspresję Foxp3 oceniano na podstawie intensywności fluorescencji (FI – fluorescence intensity) pochodzącej od fluorochromu sprzężonego z przeciwciałem anti-Foxp3.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: ▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy: * $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c



Ryc. 24 Odsetek dojrzałych tymocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+ w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

Odsetek tymocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+ w populacji CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 oraz BALB/c rano i wieczorem.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci:

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

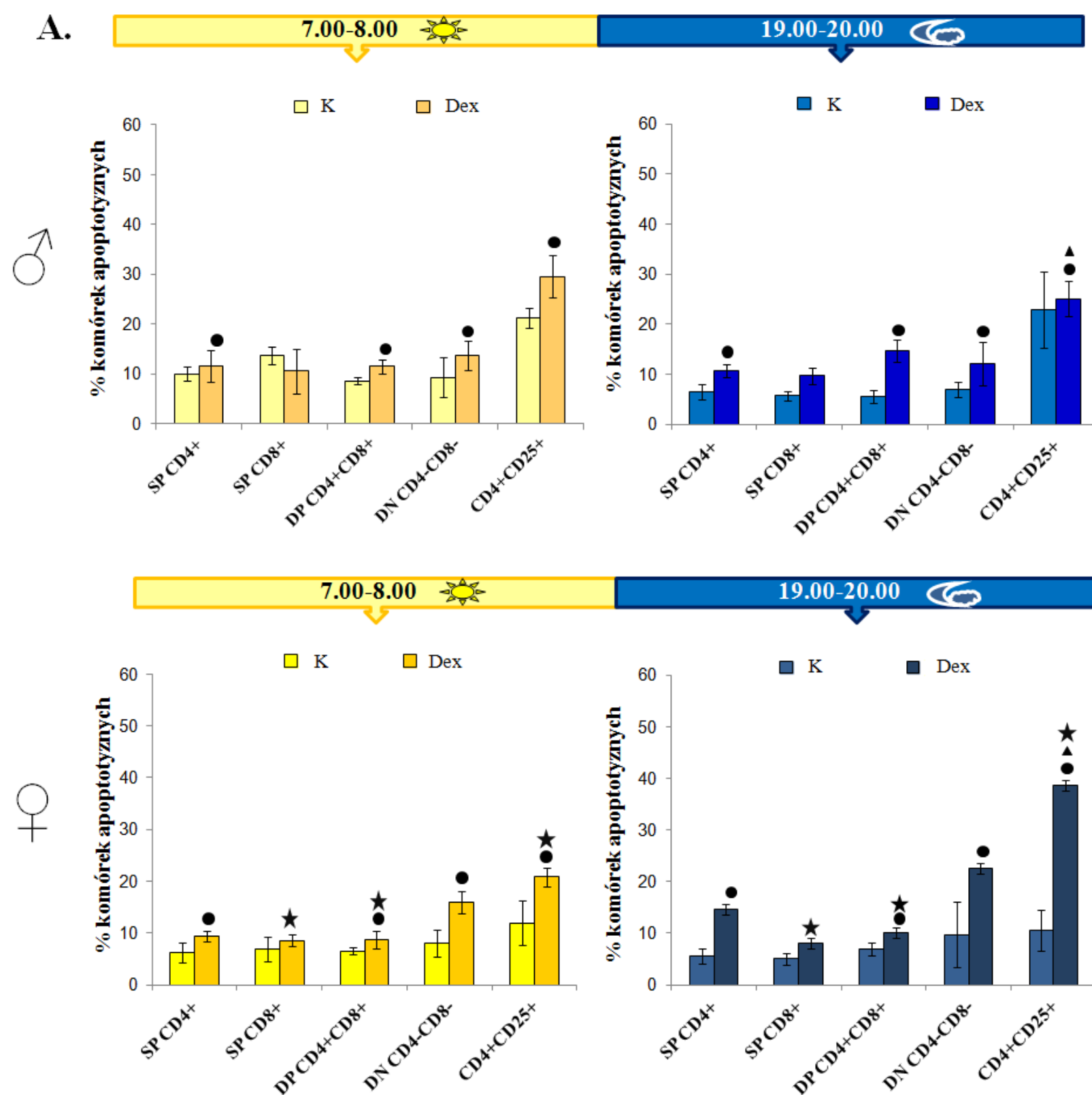
w zależności od podania Dex:

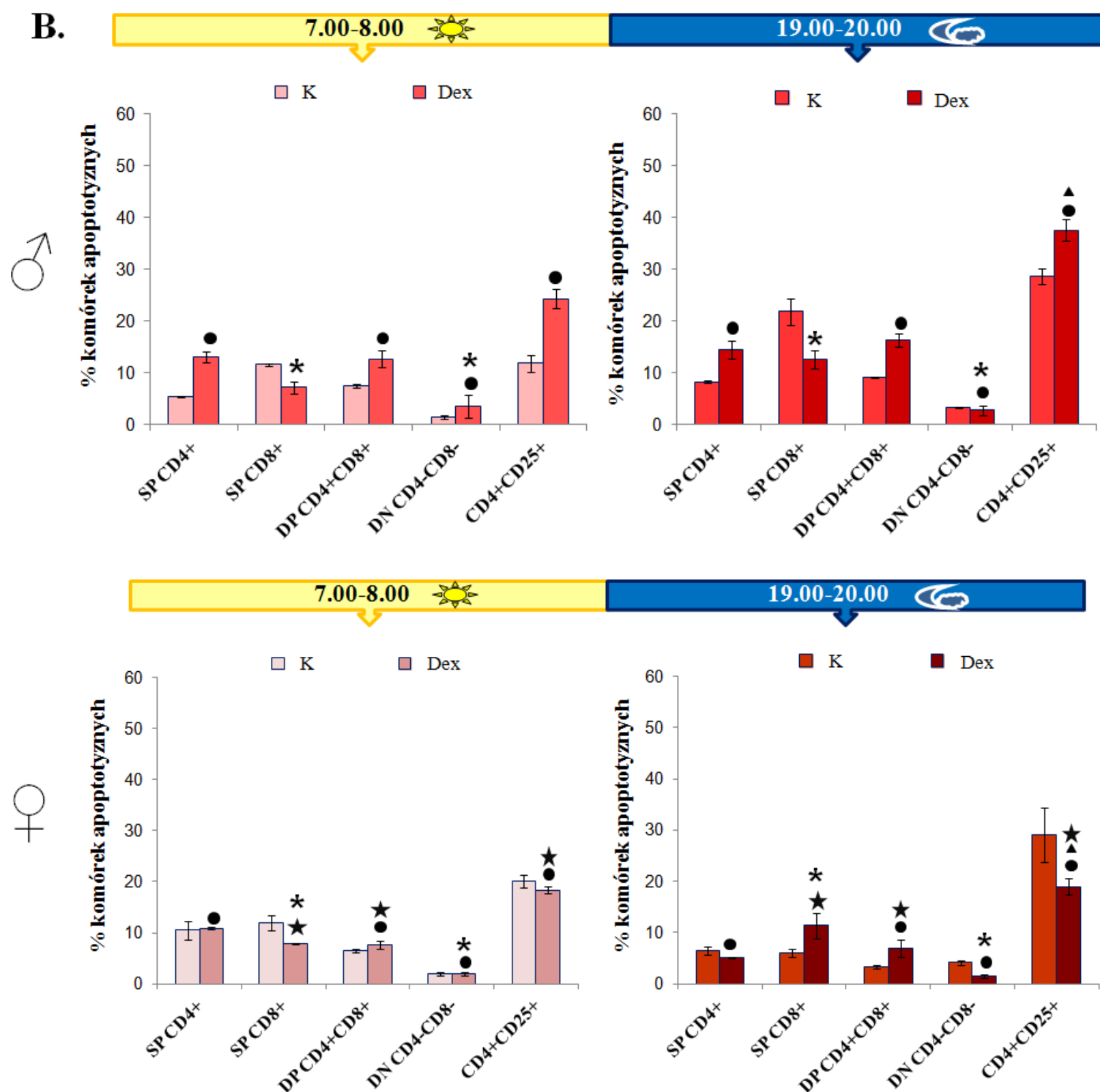
● $P < 0,05$ kontrola vs Dex

5.2.3 Poziom apoptozy tymocytów w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

W grasicach myszy traktowanych deksametazonem wykazano istotne statystycznie zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych w populacji SP CD4+ ($P < 0,0002$), DP CD4+CD8+ ($P < 0,000001$), DN CD4-CD8- ($P < 0,0003$) i CD4+CD25+ ($P < 0,0004$) w obu szczepach myszy niezależnie od pory dnia (**Ryc. 25**). Wykazano różnice w poziomie apoptozy zależne od płci w grasicach myszy BALB/c traktowanych deksametazonem, w których odsetek tymocytów ulegał zmniejszeniu z wyjątkiem populacji DP CD4+CD8+. W porównaniu do samców, w grasicach samic obu szczepów myszy zaobserwowano mniejszy odsetek komórek apoptotycznych w populacji SP CD8+ ($P < 0,004$), CD4+CD25+ ($P < 0,03$) i DP CD4+CD8+ ($P < 0,0001$) niezależnie od pory dnia. Stwierdzono istotne zmiany w poziomie apoptozy tymocytów SP CD8+ ($P < 0,03$) i DN ($P < 0,00001$) zależne od szczepu myszy: w porównaniu do szczepu C57BL6, rano u myszy BALB/c w obu populacjach tymocytów odsetek komórek apoptotycznych jest mniejszy, natomiast wieczorem w populacji DP mniejszy a w SP CD8+ większy.

Podsumowanie: iniekcja deksametazonu skutkuje zwiększeniem odsetka komórek apoptotycznych we wszystkich populacjach tymocytów poza SP CD8+. Poziom apoptozy nie wykazuje rytmiczności dobowej, a tymocyty samic obu szczepów wykazują mniejszą wrażliwość na indukcję apoptozy.





Ryc. 25 Poziom apoptozy tymocytów w grasicach myszy traktowanych deksametazonem

Odsetek komórek apoptotycznych w populacji tymocytów samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: \blacktriangle $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci: \star $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

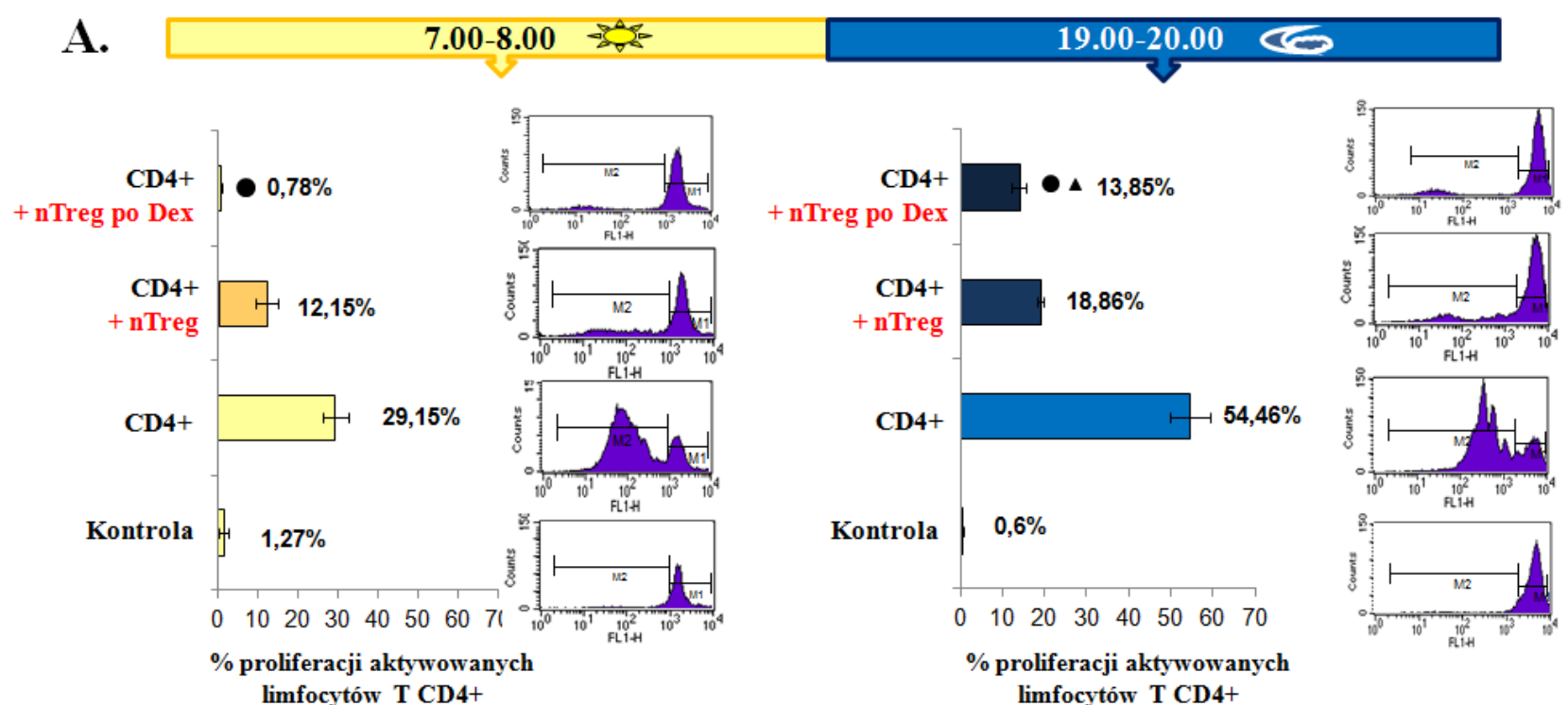
w zależności od szczepu myszy: $*$ $p < 0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

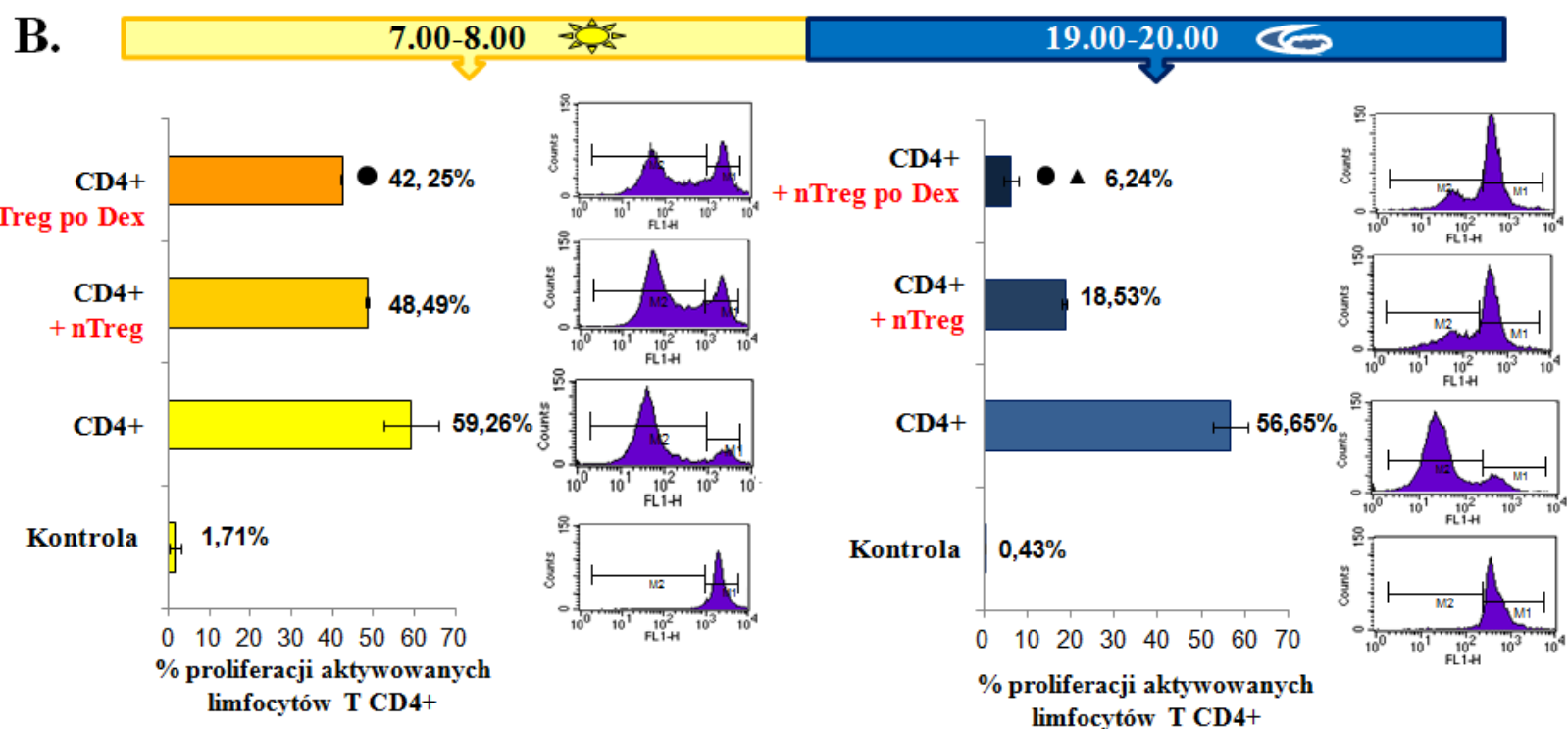
w zależności od podania Dex: \bullet $P < 0,05$ kontrola vs Dex

5.2.4 Aktywność supresorowa nTreg myszy traktowanych deksametazonem

Zbadano aktywność supresorową limfocytów nTreg izolowanych z grasic myszy traktowanych deksametazonem w teście hamowania proliferacji limfocytów T węzłów chłonnych aktywowanych przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 w 72-godzinnej hodowli in vitro. W badaniach wykorzystano jedynie myszy szczepu C57BL/6. Traktowanie myszy deksametazonem spowodowało istotne statystycznie zwiększenie hamowania proliferacji aktywowanych limfocytów T CD4⁺ w obecności nTreg ($P < 0,03$) (**Ryc. 26A i B**). Wykazano istotne statystycznie zwiększenie aktywności supresorowej nTreg myszy traktowanych Dex, mierzone % hamowania proliferacji limfocytów T CD4⁺ w porównaniu z kontrolą (nTreg myszy nietraktowanych Dex), wieczorem ($P < 0,04$) (**Ryc. 26C**). Ponadto, wykazano istotne różnice w aktywności supresorowej nTreg zależne od płci ($P < 0,04$). Rano, po podaniu Dex wykazano większą aktywnością supresorową nTreg samców ($P < 0,03$), a wieczorem nTreg samic ($P < 0,02$).

Podsumowanie: deksametazon wpływa na zwiększenie aktywności supresorowej limfocytów nTreg przy zachowaniu rytmiczności tego procesu w zależności od pory dnia.





C.

Limfocyty nTreg pochodzące od:	% hamowania limfocytów T SP CD4+	
	7.00 – 8.00	19.00 – 20.00
Samce	58%	73% ▲
Samce po Dex	97% ●	75% ● ▲
Samice	18% ★	67% ▲ ★
Samice po Dex	29% ●	89% ● ▲ ★

Ryc. 26 Aktywność supresorowa limfocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+ samców i samic myszy C57BL/6 traktowanych deksametazonu

Na wykresach słupkowych przedstawiono odsetek proliferujących limfocytów T CD4+ samców (A) oraz samic (B) szczepu C57BL/6 rano i wieczorem. Najbardziej reprezentatywne wyniki przedstawiono w postaci histogramów. **Kontrola** – nieaktywowane limfocyty T CD4+; **CD4+** - aktywowane limfocyty T CD4+ bez nTreg; **CD4+ + nTreg** - aktywowane limfocyty T CD4+ w obecności nTreg izolowanych z myszy nietraktowanych Dex; **CD4+ + nTreg po Dex** - aktywowane limfocyty T CD4+ w obecności izolowanych z myszy traktowanych Dex (C) Zestawienie aktywności supresorowej limfocytów nTreg wyrażonej % hamowania docelowych limfocytów T CD4+ w zależności od pory dnia.

Analiza statystyczna (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: ▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
(test t-Studenta) samice rano vs samice wieczór

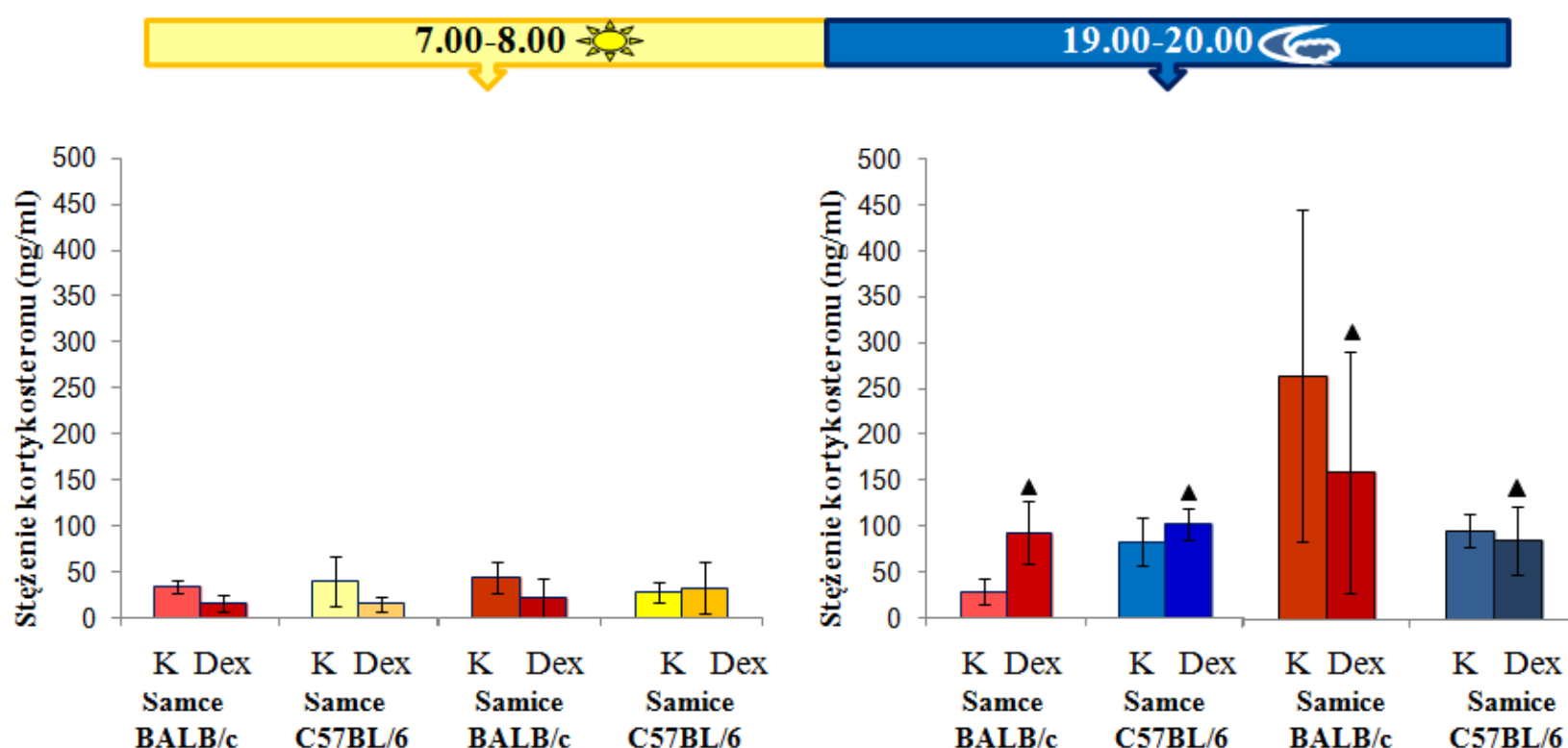
w zależności od podania Dex: ● $P < 0,05$ kontrola vs Dex
(trzy-czynnikowa ANOVA)

w zależności od płci: ★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
(trzy-czynnikowa ANOVA) samce wieczór vs samice wieczór

5.2.5 Stężenie glukokortykoidów w osoczu myszy traktowanych deksametazonem

W osoczu myszy traktowanych deksametazonem wykazano (mimo braku istotności statystycznej) zahamowanie syntezy endogennych glukokortykoidów – kortykosteronu, co szczególnie widoczne jest rano oraz wieczorem u samic. Odnotowano także, w zależności od pory dnia, zwiększenie stężenia kortykosteronu wieczorem niezależnie od szczepu myszy i płci ($P < 0,0003$) (**Ryc. 27**).

Podsumowanie: traktowanie myszy deksametazonem powoduje hamowanie syntezy kortykosteronu, nie wpływając jednak na rytmiczność jego syntezy zależną od pory dnia.



Ryc. 27 Stężenie kortykosteronu w osoczu myszy traktowanych deksametazonem

Stężenie kortykosteronu w osoczu samców i samic szczepu C57BL/6 oraz BALB/c rano i wieczorem. K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

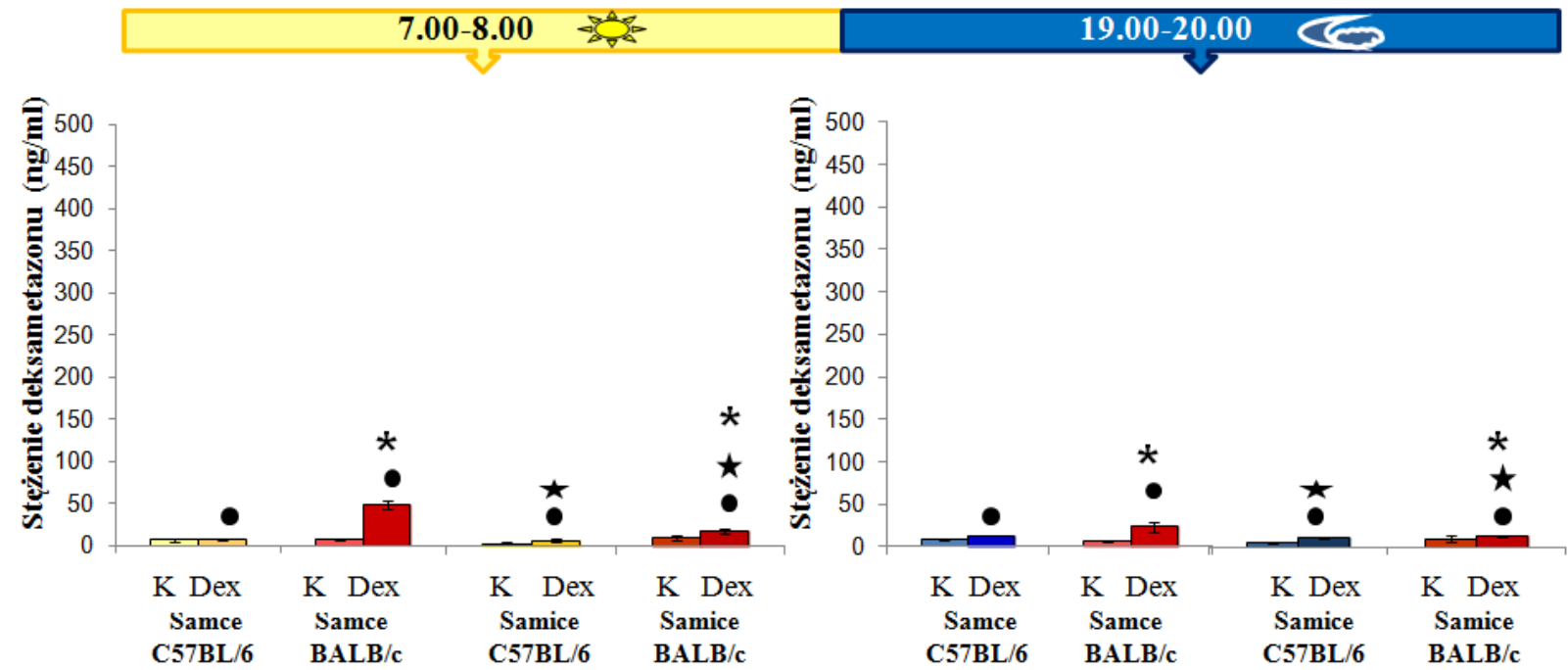
Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

Analiza stężenia deksametazonu wykazała, że niezależnie od pory dnia, po podaniu deksametazonu jego obecność stwierdzono w osoczu obu szczepów myszy (0,00003) (**Ryc. 28**). Wykazano zmiany w poziomie deksametazonu zależne od płci: w osoczu samic stężenie deksametazonu jest mniejsze ($P<0,03$). Uzyskane wyniki wskazują na zmiany w poziomie Dex zależne od szczepu myszy: w osoczu myszy BALB/c stężenie deksametazonu jest większe niezależnie od pory dnia i płci ($P<0,0001$).

Podsumowanie: traktowanie myszy deksametazonem nie wpływało na zmianę rytmiczności stężenia kortykosteronu zależnej od pory dnia.



Ryc. 28 Stężenie deksametazonu w osoczu myszy traktowanych deksametazonem

Stężenie deksametazonu w osoczu samców i samic szczepu C57BL/6 oraz BALB/c rano i wieczorem. K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od płci:

★ $p<0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy:

* $p<0,05$ szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

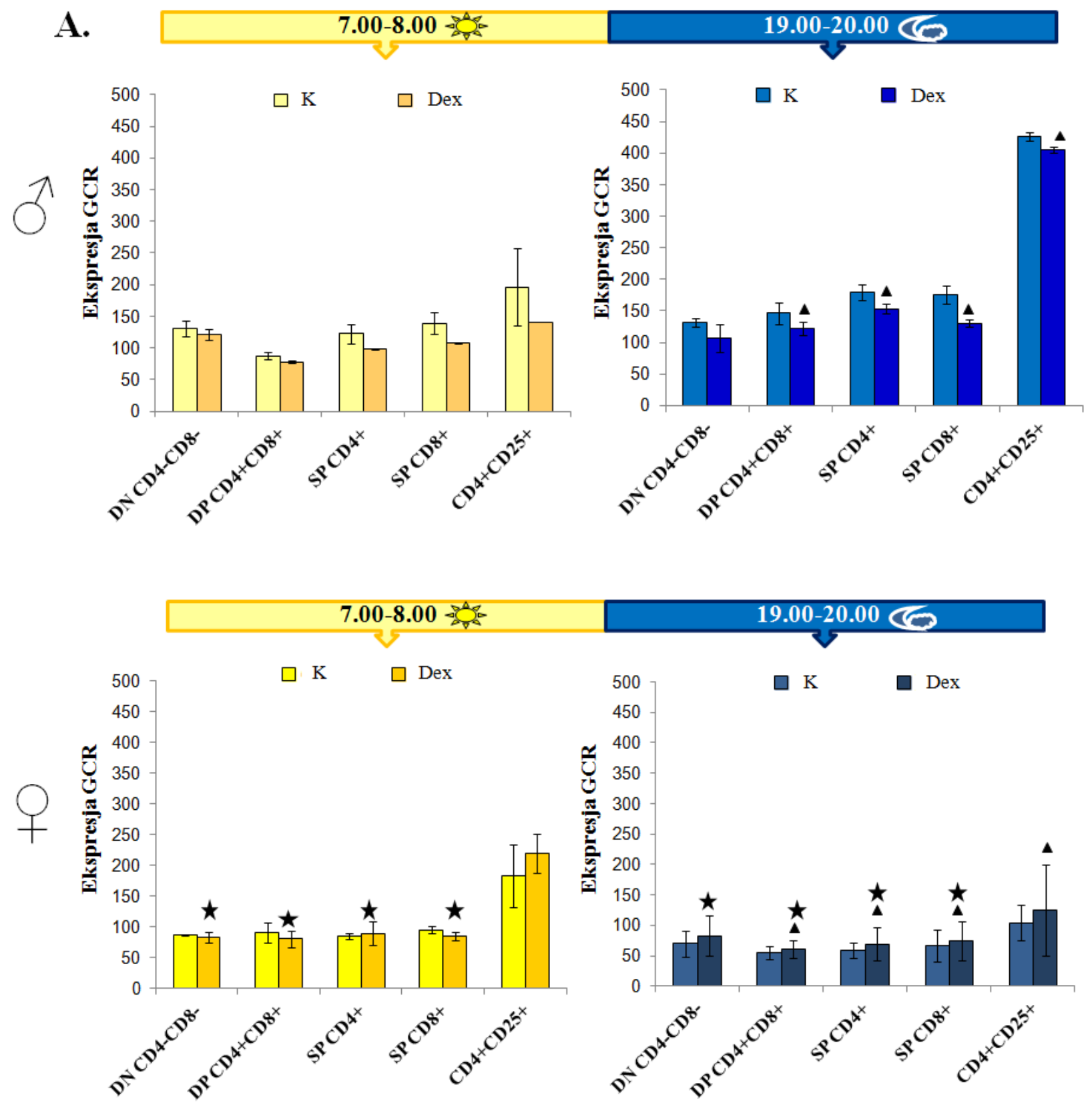
w zależności od podania Dex:

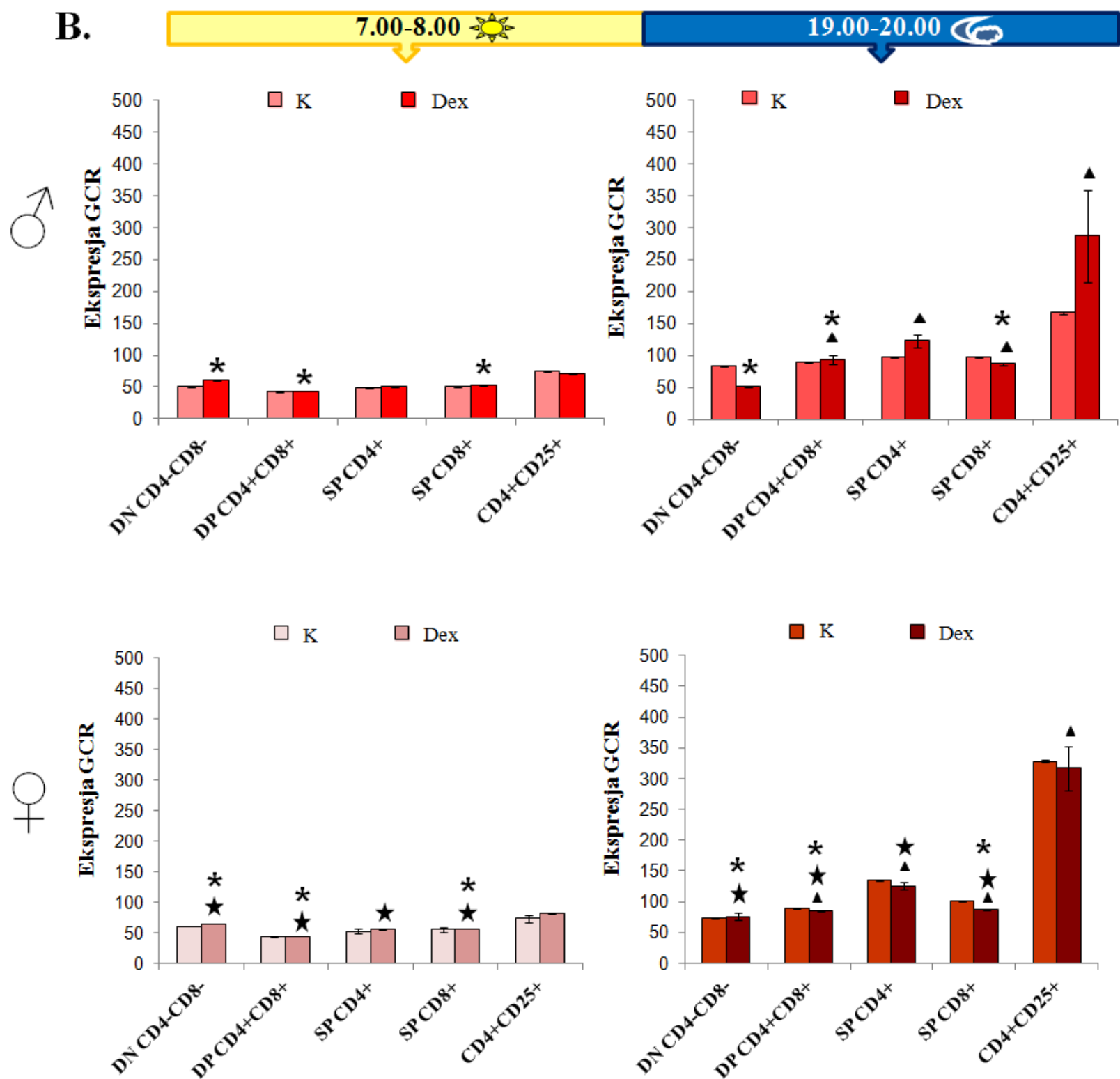
● $P<0,05$ kontrola vs Dex

5.2.6 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach myszy traktowanych deksametazonem

W grasicach myszy traktowanych deksametazonem zaobserwowano istotne statystycznie różnice w populacji DP CD4+CD8+ ($P<0,004$), SP CD4+ ($P<0,002$), SP CD8+ ($P<0,04$) i CD4+CD25+ ($P<0,001$) w zależności od pory dnia (**Ryc. 29**). Wieczorem w populacjach DP CD4+CD8+, SP CD4+, SP CD8+ i CD4+CD25+ wykazano większą ekspresję GCR w obu szczepach myszy. Ponadto w populacji DP CD4+CD8+ ($P<0,01$), SP CD4+ ($P<0,02$) i SP CD8+ ($P<0,003$) wykazano istotne zmiany zależne od płci. W grasicach samic C57BL/6 traktowanych deksametazonem ekspresja GCR w populacjach DP CD4+CD8+, SP CD4+ i SP CD8+ zmniejszyła się. Natomiast w przypadku samic BALB/c odnotowano zwiększenie ekspresji GCR w tych populacjach komórek. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w ekspresji GCR pomiędzy szczepami w populacjach DP ($P<0,01$), SP CD8+ ($P<0,001$) i DN ($P<0,00002$). Niezależnie od pory dnia, samce BALB/c charakteryzują się mniejszą ekspresją GCR w populacjach tych komórek. Pododną zależność odnotowano rano w przypadku samic BALB/c.

Podsumowanie: po podaniu deksametazonu ekspresja GCR w tymocytach nie zmienia się w porównaniu do tymocytów myszy kontrolnych nietraktowanych Dex.





Ryc. 29 Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach po podaniu deksametazonu w cyklu dobowym

Ekspresja receptorów dla glukokortykoidów w tymocytach samców i samic szczepu C57BL/6 (A) oraz BALB/c (B) rano i wieczorem. K – kontrola; Dex – deksametazon;

Analiza statystyczna: cztero-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia: ▲ p<0,05 samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór

w zależności od płci: ★ p<0,05 samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

w zależności od szczepu myszy: * p<0,05 szczep C57BL/6 vs szczep BALB/c

6. DYSKUSJA

6.1 Rozwój naturalnych regulatorowych limfocytów T wykazuje zmienność zależną od pory dnia

Celem pierwszej części pracy było zbadanie występowania rytmiczności rozwoju naturalnych regulatorowych limfocytów T, bądź jej braku, w zależności od pory dnia w dwóch wybranych punktach czasowych, rano (7.00-8.00) i wieczorem (19.00-20.00), odpowiadających najmniejszemu i największemu stężeniu endogennych glukokortykoidów (**Ryc. 18**).

Wyniki badań wskazały na występowanie zmian w rozkładzie głównych populacji tymocytów w zależności od pory dnia: wieczorem, zaobserwowano zmiany w odsetkowym składzie głównych populacji tymocytów sugerujące ukierunkowanie dojrzewania tymocytów w stronę populacji SP CD4+, zarówno w grasicach myszy C57BL/6 jak i BALB/c (**Ryc.11**). Według badań Dimitrov i wsp., w nocy w ludzkiej krwi obwodowej liczba krążących limfocytów T CD4+ jest większa niż w dzień. Badacze wskazali także na związek liczby krążących limfocytów T ze zmianami stężenia endogennych glukokortykoidów. Przeanalizowali w populacji limfocytów T CD4+ i CD8+ krwi obwodowej występowanie limfocytów naiwnych, pamięci i efektorowych pamięci na podstawie ekspresji powierzchniowych białek CD45RA i CD62L. Wykazali, że wieczorem zwiększa się liczba limfocytów naiwnych (CD45RA+CD62L+), pamięci (CD45RA–CD62L+) oraz efektorowych pamięci (CD45RA–CD62L–) [198]. Jest zatem prawdopodobne, że zarówno u ludzi (rano) jak i myszy (wieczorem), kiedy stężenie endogennych GC w osoczu osiąga maksimum, w grasicy dochodzi do różnicowania i dojrzewania limfocytów T SP CD4+, które następnie migrują do obwodowych narządów limfoidalnych tworząc pulę limfocytów T naiwnych. Ponadto, na podstawie analizy skrawków grasicy myszy z wklonowanym pod promotorem genu *Per2* (gen zegara biologicznego) – genem reporterowym *lucyferazy* stwierdzono, że w rdzeniu grasicy zawierającym dużą liczbę limfocytów T występuje rytmiczność dobową związana ze zmianami stężenia lucyferazy [199], co może wskazywać na rytmiczność rozwoju tymocytów. Wyniki badań Prendergast i wsp., dotyczące wpływu długości dnia na funkcje i liczbę limfocytów T szczurów wykazały, że przy krótszym dniu/dłuższej nocy w krwi obwodowej szczurów występuje większa liczba limfocytów T CD3+, CD8+, CD8+CD25+, CD4+CD25+ [200]. Być może długotrwałe działanie zwiększonego stężenia

endogennych GC w nocy wpływa na wzrost proliferacji limfocytów T i powoduje ich zwiększoną migrację do obwodowych narządów limfoidalnych. Może to być również związane z działaniem innych hormonów stymulujących rozwój tymocytów takich jak prolaktyna, hormon wzrostu, melatonina [201-203].

Wyniki badań przedstawionych w niniejszej rozprawie wskazują na występowanie różnic w kinetyce rozwoju tymocytów w zależności od płci. W grasicach samic obu szczepów myszy, C57BL/6 i BALB/c, wykazano mniejszy odsetek tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺ oraz większy odsetek tymocytów DP CD4⁺CD8⁺ niezależnie od pory dnia (**Ryc. 11**). Wyniki tych badań sugerują następujące wnioski: w grasicach samic może zachodzić większa proliferacja tymocytów DP CD4⁺CD8⁺ i zwiększona migracja dojrzałych tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺ do obwodowych narządów limfoidalnych lub odwrotnie, może występować wolniejsze dojrzewanie tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺ i tym samym większy odsetek tymocytów DP. W krwi obwodowej kobiet występuje mniejsza liczba limfocytów T CD8⁺, natomiast większa liczba limfocytów T SP CD4⁺ oraz wyższy stosunek CD4/CD8 [204-209]. Prawdopodobnie, różnice te wynikają z działania hormonów płciowych – estrogenów. U pacjentów z obniżonym poziomem estrogenów odnotowano zwiększenie liczby limfocytów T SP CD8⁺ oraz zmniejszenie proporcji CD4/CD8 [210]. Występowanie mniejszej liczby limfocytów T CD8⁺ u samic obu szczepów może wiązać się z zwiększoną zachorowalnością na choroby autoimmunizacyjne. Pender i wsp. odnotowali spadek limfocytów T CD8⁺ u osób chorych na stwardnienie rozsiane [211]. W innych badaniach wykazano także, że liczba limfocytów T CD8⁺ szczególnie szybko zmniejsza się w okresie dojrzewania płciowego [209, 212] oraz w procesie starzenia [204, 209, 213].

Wyniki badań opisane w tej pracy wskazują na różną kinetykę rozwoju tymocytów w zależności od typu odpowiedzi immunologicznej, Th1 i Th2. Jak już wspomniano, myszy szczepu C57BL/6 i BALB/c różnią się typem odpowiedzi immunologicznej, odpowiednio Th1 i Th2. Limfocyty Th1 syntetyzują głównie IFN- γ , IL-2 i TNF- α , wspomagając aktywację i prezentację antygeny przez makrofagi i pełnią ważną funkcję w odpowiedzi komórkowej przeciwko mikroorganizmom. Limfocyty Th2 syntetyzują IL-4, IL-10 i IL-13, uczestniczące w stymulacji eozynofili i limfocytów B w odpowiedzi humoralnej przeciwko pasożytom. Wyniki własnych badań wskazują na przewagę rozwoju tymocytów SP CD4⁺ w obu szczepach myszy, przy czym proces ten przebiega intensywniej w grasicach myszy BALB/c (o typie odpowiedzi Th2) zarówno rano jak i wieczorem (**Ryc.**

11). Wyniki innych badaczy wskazują na przewagę limfocytów T CD4⁺ w krwi obwodowej, śledzionie i węzłach chłonnych myszy BALB/c oraz przewagę limfocytów T CD8⁺ w tych samych narządach myszy C57BL/6 [214, 215]. Ci sami badacze zwracają uwagę, że odsetek limfocytów CD8⁺ odwrotnie koreluje z odsetkiem limfocytów CD4⁺CD25⁺. Murakami i wsp. wykazali, że limfocyty T CD4⁺CD25⁺ regulują liczbę limfocytów T CD8⁺ pamięci [216], a przypuszczalnie mogą wpływać na całkowitą liczbę limfocytów T CD8⁺. Niewykluczone zatem, że również w grasicy na proporcje SP CD4⁺/SP CD8⁺ ma wpływ liczebność populacji tymocytów CD4⁺CD25⁺.

Według danych z piśmiennictwa, na równowagę odpowiedzi Th1/Th2 wpływają zarówno hormony jak i regulatorowe limfocyty T CD4⁺CD25⁺. W badaniach *in vitro* Bollinger i wsp. wykazali, że ludzkie limfocyty T CD4⁺CD25⁺ hamują wydzielanie cytokin IFN- γ , IL-2 i TNF- α charakterystycznych dla typu odpowiedzi Th1, natomiast nie wpływają na syntezę IL-4, IL-6, IL-10 czy IL-17A [217]. Inni badacze stwierdzili, że w mysie limfocyty nTreg nie wykazują właściwości supresorowych wobec limfocytów Th2 [218]. Wyniki badań własnych wykazują większy odsetek limfocytów T CD4⁺CD25⁺ w grasicach myszy BALB/c (o typie odpowiedzi Th2) w porównaniu do szczepu C57BL/6 (typ odpowiedzi Th1) (**Ryc. 12**). Podobne wyniki uzyskali wcześniej Chen i wsp. wskazujące na zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺ w grasicy i obwodowych narządach limfoidalnych myszy BALB/c w porównaniu do odsetka limfocytów T CD4⁺CD25⁺ myszy C57BL/6 [215]. Według Liu i wsp., myszy C57BL/6 charakteryzują się występowaniem bardziej dojrzałych komórek dendrytycznych niż myszy BALB/c. Komórki dendrytyczne izolowane z myszy C57BL/6 mają na swojej powierzchni znacznie większą ekspresję białek odpowiedzialnych za aktywację naiwnych limfocytów T CD4⁺ (CD86, CD40, MHC II) oraz syntetyzują więcej IL-12 niezbędnej do różnicowania aktywowanych limfocytów T CD4⁺ w kierunku efektorowych limfocytów Th1 [219]. Niedojrzałe, tolerogenne komórki dendrytyczne (Tol-DC) wykazują mniejszą ekspresję CD86, CD80, CD40, MHC II i syntetyzują mniej IL-12 [220]. Jest zatem prawdopodobne, że komórki dendrytyczne myszy BALB/c wykazują przewagę fenotypu tolerogenicznego. Niewykluczone również, że mogą migrować do grasicy i przyczyniać się do powstawania większej liczby regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺ [221, 222]. Wyniki własnych badań wskazują na brak zmian odsetka tymocytów CD4⁺CD25⁺ myszy BALB/c w zależności od pory dnia (**Ryc. 12**). W przypadku szczepu C57BL/6 odnotowano większy odsetek tymocytów CD4⁺CD25⁺ wieczorem zarówno u samic jak i samców, przy czym

wyraźnie większy odsetek CD4+CD25+ odnotowano w grasicach samic. Zatem rozwój nTreg wykazuje rytmiczność zależną od pory dnia, płci i typu odpowiedzi immunologicznej.

Wśród tymocytów CD4+CD25+ wyróżnia się odrębne populacje różniące się ekspresją białka CD25: CD4+CD25^{low} i CD4+CD25^{high}, które reprezentują kolejne stadia rozwojowe nTreg różniące się liczebnością komórek Foxp3+ i ekspresją czynnika Foxp3. Powszechnie uważa się, że czynnik transkrypcyjny Foxp3 jest kluczowy w rozwoju i funkcji supresorowej nTreg [11, 38, 44]. Wyniki badań Karagiannidis i wsp. wskazują, że syntetyczne glukokortykoidy podawane chorym na astmę prowadzą do zwiększenia ekspresji mRNA dla Foxp3 w pochodzących od tych pacjentów limfocytach SP CD4+, co skutkuje zwiększeniem liczby limfocytów CD4+CD25+ [141]. Wyniki moich badań wskazują na podobną zależność pomiędzy stężeniem endogennych glukokortykoidów a odsetkiem tymocytów CD4+CD25^{low}Foxp3+ i CD4+CD25^{high}Foxp3+. W grasicach obu szczepów myszy wykazano zwiększenie odsetka tymocytów CD4+CD25^{low}Foxp3+ i CD4+CD25^{high}Foxp3+ wieczorem przy wyższym stężeniu endogennych glukokortykoidów, przy czym odsetek obu populacji tymocytów jest większy u samców (**Ryc. 13**). U ludzi, większy odsetek limfocytów CD4+CD25^{high}Foxp3+ stwierdzono w krwi obwodowej mężczyzn [223, 224]. Ponadto wyniki moich badań wskazują, że niezależnie od pory dnia, grasicę myszy BALB/c charakteryzują się większym odsetkiem tymocytów CD4+CD25^{low}Foxp3+ i CD4+CD25^{high}Foxp3+ (**Ryc. 13**). Ta różnica być może jest skutkiem odmiennego poziomu syntezy IL-2 w obu badanych szczepach myszy, C57BL/6 i BALB/c. Jak już wcześniej wspomniano, IL-2 pełni ważną rolę w rozwoju, proliferacji i funkcji limfocytów nTreg. W grasicach oraz w obwodowych narządach limfoidalnych myszy IL-2Rβ^{-/-} zaobserwowano zmniejszenie liczby limfocytów T CD4+CD25+ [225, 226]. Wyniki badań innych badaczy wskazują, iż stężenie IL-2 syntetyzowane przez komórki odpornościowe myszy BALB/c osiąga większe stężenie niż w przypadku myszy C57BL/6 [225, 227].

Wyniki badań opisanych w rozprawie wskazują na rytmiczność rozwoju nTreg zależną od pory dnia. Wieczorem wykazano zwiększenie odsetka dojrzałych limfocytów nTreg CD4+CD25+Foxp3+, co szczególnie widoczne jest w grasicach szczepu myszy C57BL/6 (**Ryc.15**). Ponadto odnotowano zwiększenie odsetka dojrzałych limfocytów nTreg względem całej populacji tymocytów wieczorem w obu szczepach myszy C57BL/6 i BALB/c zarówno rano (odpowiednio 0,07% i 0,31%) jak i wieczorem (odpowiednio

0,12% i 0,38%). Nasuwa to przypuszczenie, że zwiększenie odsetka nTreg wieczorem może być związane ze zwiększeniem stężenia endogennych GC. Sprawdzono zatem czy obserwowane zmiany w rozwoju nTreg mogą wynikać z różnicy poziomu apoptozy indukowanej przez GC w populacjach tymocytów w zależności od pory dnia. Najmniejszą wrażliwością na apoptozę GC-zależną charakteryzują się limfocyty nTreg, niewykluczone zatem, że zwiększenie odsetka nTreg może wynikać z różnicy wrażliwości na endogenne glukokortykoidy [174, 178]. Wyniki badań własnych nie wskazują, aby zmienność kinetyki rozwoju nTreg była wynikiem różnicy w poziomie apoptozy między nTreg i innymi populacjami tymocytów. W obu szczepach myszy nie odnotowano istotnych różnic w odsetku komórek apoptotycznych w głównych populacjach tymocytów i nTreg niezależnie od pory dnia i płci (**Ryc. 16**). Endogenne glukokortykoidy uczestniczą w rozwoju tymocytów w drodze różnych mechanizmów poza indukcją apoptozy. Według hipotezy „wzajemnego antagonizmu” GC poprzez receptor dla glukokortykoidów – GCR wpływają na proces selekcji tymocytów. Jak już wspomniano we wstępie, jeśli sygnały pochodzące od TCR i GCR działają osobno prowadzi to do apoptozy tymocytów. Natomiast gdy działają razem, sygnały te znoszą się wzajemnie, a tymocyty przeżywają. Tymocyty posiadające TCR o zbyt silnym powinowactwie do kompleksu MHC/własny peptyd będą ulegać apoptozie indukowanej przez TCR, gdyż sygnał pochodzący od GCR nie jest wystarczający by konkurować z sygnałem od TCR. Natomiast zbyt słabe powinowactwo TCR do kompleksu MHC/własny peptyd indukuje w tymocytach apoptozę zależną od glukokortykoidów. Zatem tymocyty z TCR o średnim powinowactwie do kompleksu MHC/własny peptyd będą chronione przed apoptozą, ponieważ sygnały od TCR i GCR będą się wzajemnie neutralizować [228, 229].

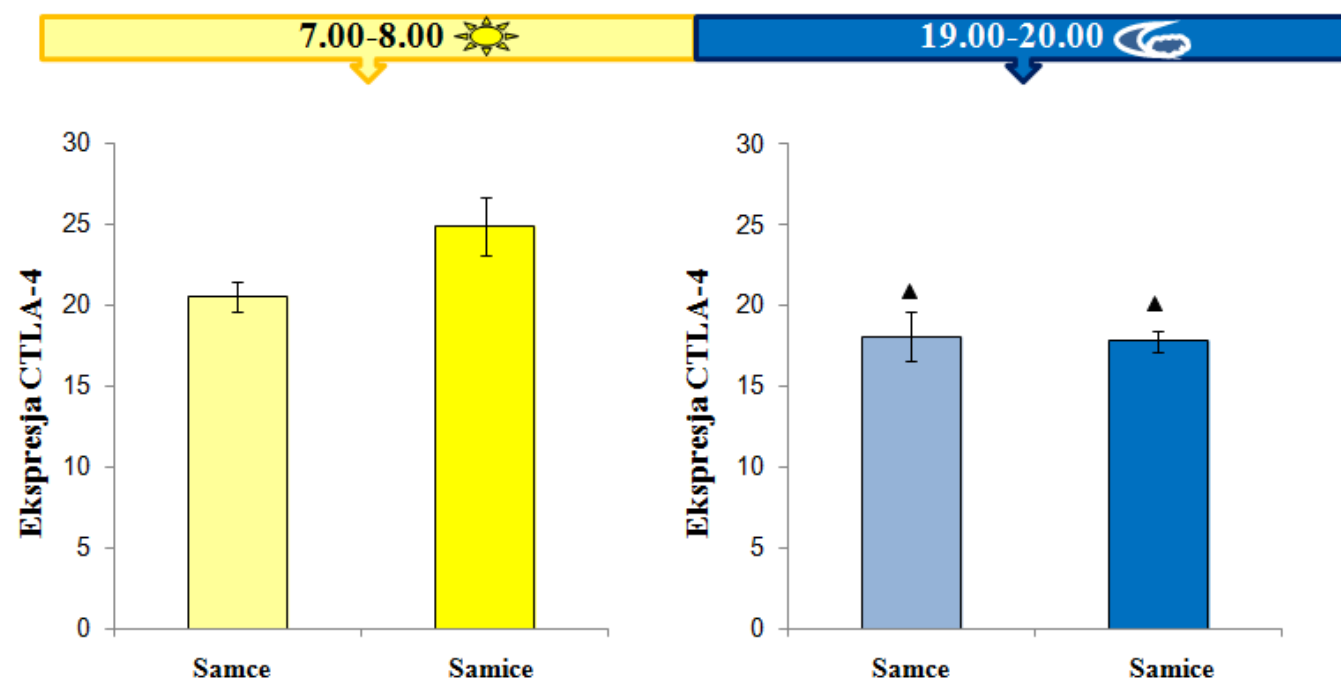
Zbadano czy istnieje związek pomiędzy zwiększeniem odsetka nTreg a stężeniem endogennych glukokortykoidów w osoczu i ekspresją receptorów dla GC w badanych punktach czasowych. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki wskazują, że wieczorem przy większym stężeniu endogennych GC występuje istotnie wyższa ekspresja GCR w badanych populacjach tymocytów w grasicach myszy BALB/c niezależnie od płci i samców myszy C57BL/6 (**Ryc. 19**). Ponadto, największa ekspresja GCR, w porównaniu do pozostałych populacji tymocytów, występuje w limfocytach nTreg niezależnie od pory dnia i szczepu myszy. Zwiększona ekspresja GCR i anty-apoptotycznego białka Bcl-2 w limfocytach nTreg, może odpowiadać za ich małą wrażliwość na apoptozę indukowaną przez GC i skutkować zwiększeniem odsetka dojrzałych nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

[176]. Stwierdzono także, że u ludzi w późnej fazie snu, tuż przed przebudzeniem, kiedy zwiększa się stężenie endogennych GC dochodzi do przewagi odpowiedzi typu Th2. Ponadto, według innych badań poziom IL-2 wydzielanej przez ludzkie limfocyty T CD4+ nie zmienia się w zależności od pory dnia, jak zaobserwowano w przypadku IL-4 czy IFN- γ [230]. Prawdopodobnie wysokie stężenie endogennych GC, wysoka ekspresja GCR i stały poziom syntezy IL-2 mogą mieć ważny udział w rozwoju, utrzymaniu homeostazy i ekspansji dojrzałych limfocytów nTreg do obwodowych narządów limfoidalnych.

6.2 Naturalne regulatorowe limfocyty T wykazują zmienną aktywność supresorową zależną od pory dnia

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na występowanie rytmicznych zmian aktywności supresorowej nTreg w zależności od pory dnia. Wieczorem, zarówno u samców jak i samic wykazano istotne zwiększenie aktywności supresorowej nTreg (**Ryc. 17**). U ludzi podobne obserwacje odnotowano w przypadku limfocytów nTreg pochodzących z krwi obwodowej. Zaobserwowano, że podczas snu występuje większa aktywność supresorowa nTreg. Zgodnie z wynikami innych badaczy [231], nasze badania wskazują, że większa aktywność supresorowa nTreg wieczorem koreluje ze zwiększeniem ekspresji czynnika Foxp3 odpowiedzialnego za funkcje supresorowe nTreg (**Ryc. 14**). Ponadto w aktywności supresorowej nTreg wykazano różnice zależne od płci. Limfocyty nTreg samic wykazują mniejszą aktywność supresorową, co może być związane z występowaniem u samic przewagi odpowiedzi Th1 i mniej sprzyjającego środowiska cytokinowego do funkcjonowania limfocytów nTreg.

Na podstawie wstępnych badań określono, czy różnice w aktywności supresorowej nTreg zależne od pory dnia i płci mogą wynikać z różnego poziomu ekspresji markerów CTLA-4 i LAG-3 związanych z aktywacją funkcji supresorowej limfocytów nTreg [123-126]. Co ciekawe, nie zauważono zwiększania aktywności supresorowej nTreg i jednoczesnego zwiększenia ekspresji CTLA-4 czy LAG-3 (**Ryc. 30** i **Ryc. 31**). Wyniki tych badań wskazują, że cząsteczki CTLA-4 i LAG-3 nie są odpowiedzialne za zwiększenie funkcji supresorowych limfocytów nTreg wobec limfocytów T CD4+ wieczorem. Być może, działanie limfocytów nTreg w hodowlach *in vitro* opierało się głównie na udziale charakterystycznych dla nich cytokin IL-10, IL-35 czy TGF- β [95, 99, 103]. Nie analizowano stężenia tych cytokin w supernatancie pohodowlanym, zatem wyjaśnienie tej kwestii wymaga kontynuacji badań.



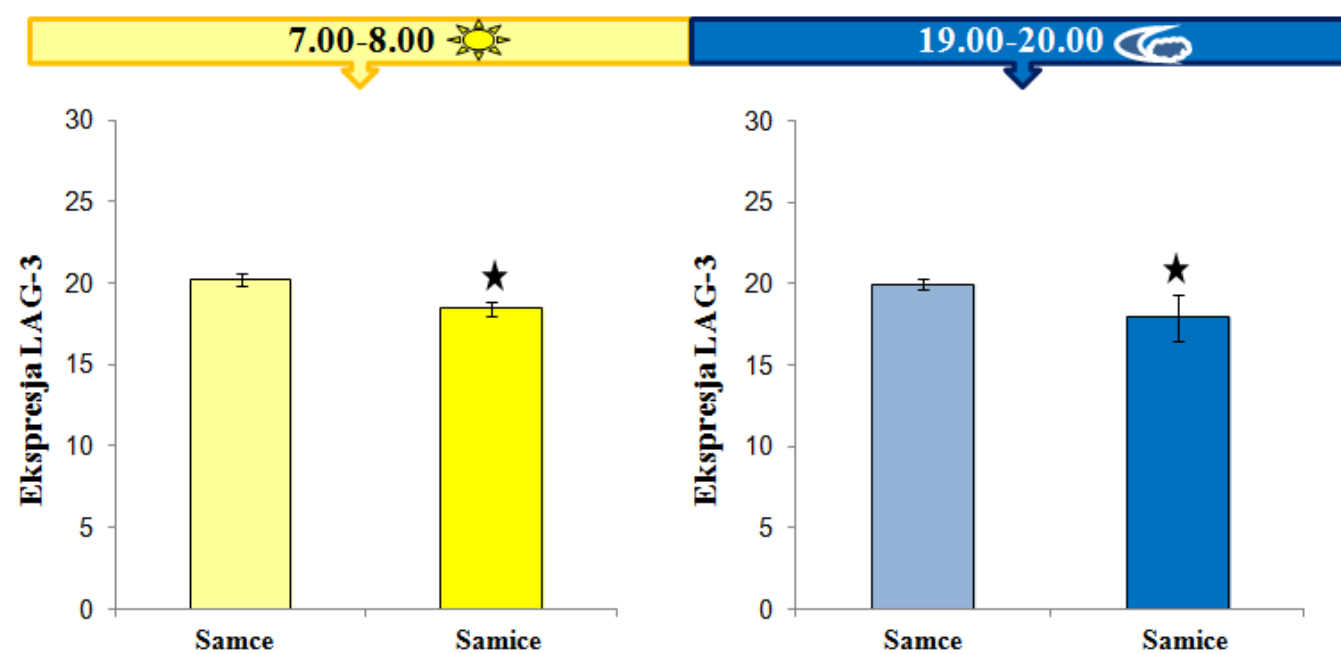
Ryc. 30 Ekspresja CTLA-4 na tymocytach CD4+CD25+ myszy C57BL/6

Ekspresja CTLA-4 w tymocytach CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: dwu-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór



Ryc. 31 Ekspresja LAG-3 na tymocytach CD4+CD25+ myszy C57BL/6

Ekspresja LAG-3 w tymocytach CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 rano i wieczorem.

Analiza statystyczna: dwu-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od płci:

★ $p < 0,05$ samce rano vs samice rano
samce wieczór vs samice wieczór

6.3 Deksametazon wzmacnia zależne od pory dnia zmiany w rozwoju nTreg zachodzące w warunkach fizjologicznych

Celem drugiej części pracy było określenie wpływu egzogennych glukokortykoidów na regulację rozwoju i aktywności supresorowej limfocytów nTreg.

Wyniki badań wskazują, że traktowanie myszy deksametazonem nasila rytmiczne zmiany w rozwoju tymocytów charakterystyczne dla warunków fizjologicznych. Podobnie jak w grasicach myszy nietraktowanych deksametazonem, w grasicach myszy BALB/c podanie Dex powodowało przekierowanie rozwoju tymocytów w stronę populacji SP CD4⁺ (**Ryc. 20**). W przypadku myszy szczepu C57BL/6 nie stwierdzono takiej zależności. Deksametazon powodował u nich zahamowanie rozwoju tymocytów SP CD4⁺ pomimo, że odsetek nTreg w tej populacji ulegał zwiększeniu. Kinetyka rozwoju tymocytów zależna od płci przedstawiała się podobnie jak w warunkach fizjologicznych. W grasicach samiec obu szczepów myszy traktowanych Dex występuje mniejszy odsetek tymocytów SP CD4⁺ i większy odsetek tymocytów DP niezależnie od pory dnia. Dootrzewnowa iniekcja deksametazonu powodowała zwiększenie odsetka tymocytów SP CD4⁺ i SP CD8⁺ tylko w grasicach myszy BALB/c, co wskazuje na większą wrażliwość myszy BALB/c (o typie odpowiedzi Th2) na działanie egzogennych glukokortykoidów.

Zaobserwowano, że skutkiem podawania deksametazonu było zwiększenie odsetka tymocytów CD4⁺CD25⁺ w obu szczepach myszy niezależnie od pory dnia, przy czym większy odsetek CD4⁺CD25⁺ podobnie jak w przypadku grupy kontrolnej (myszy nietraktowanych Dex) występuje w grasicach myszy szczepu BALB/c (**Ryc. 21**). Podobne zwiększenie odsetka CD4⁺CD25⁺ stwierdzili Chen i wsp. w szczepie myszy BALB/c traktowanych deksametazonem [176]. Jednakże zwiększenie te było jedynie wynikiem indukcji apoptozy przez Dex w innych niż nTreg populacjach tymocytów. Jak już wcześniej wspomniano, myszy BALB/c charakteryzuje przewaga niedojrzałych, tolerogennych komórek dendrytycznych (Tol-DC) biorących udział w powstawaniu regulatorowych limfocytów T [221, 222]. Badania Kooten i wsp. dowodzą, że deksametazon indukuje tolerogenne komórki dendrytyczne [232], co może mieć bezpośredni związek z rozwojem regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺.

Analiza rozwoju nTreg na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w poszczególnych stadiach różnicowania w grasicach myszy traktowanych deksametazonem, wskazuje na stymulujące działanie hormonu. W grasicach myszy traktowanych Dex wykazano zwiększenie odsetka CD4⁺CD25^{low}Foxp3⁺ jak i CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, przy

czym odsetek komórek Foxp3⁺ w obu populacjach tymocytów był mniejszy w grasicach samic (**Ryc. 22**). Większy odsetek tymocytów CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ stwierdzono w grasicach szczepu BALB/c charakteryzujących się odpowiedzią immunologiczną typu Th2 (**Ryc. 23**). Nie zaobserwowano natomiast, po zastosowaniu deksametazonu, wzrostu ekspresji Foxp3 w obu populacjach tymocytów niezależnie od pory dnia, płci i szczepu myszy. Rytmiczność ekspresji Foxp3 w tych populacjach tymocytów została jednak zachowana jak w przypadku warunków fizjologicznych.

Syntetyczne glukokortykoidy powodują wzrost odsetka limfocytów CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ obwodowych narządach limfoidalnych, takich jak śledziona, węzeł mezenteryczny, węzły pachwinowe oraz krwi obwodowej. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie dokumentują, że deksametazon uczestniczy w rozwoju nTreg w grasicy, przy czym większy odsetek dojrzałych nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ jest typowy dla myszy o typie odpowiedzi Th2 (**Ryc. 24**). Ponadto, po traktowaniu deksametazonem, podobnie jak w warunkach fizjologicznych, grasicie samic obu szczepów zawierały mniejszy odsetek dojrzałych nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Podsumowując, wyniki własnych badań wskazują, że podanie deksametazonu stymuluje rozwój dojrzałych nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nie zaburzając jednak obserwowanej wcześniej fizjologicznej rytmiczności rozwoju.

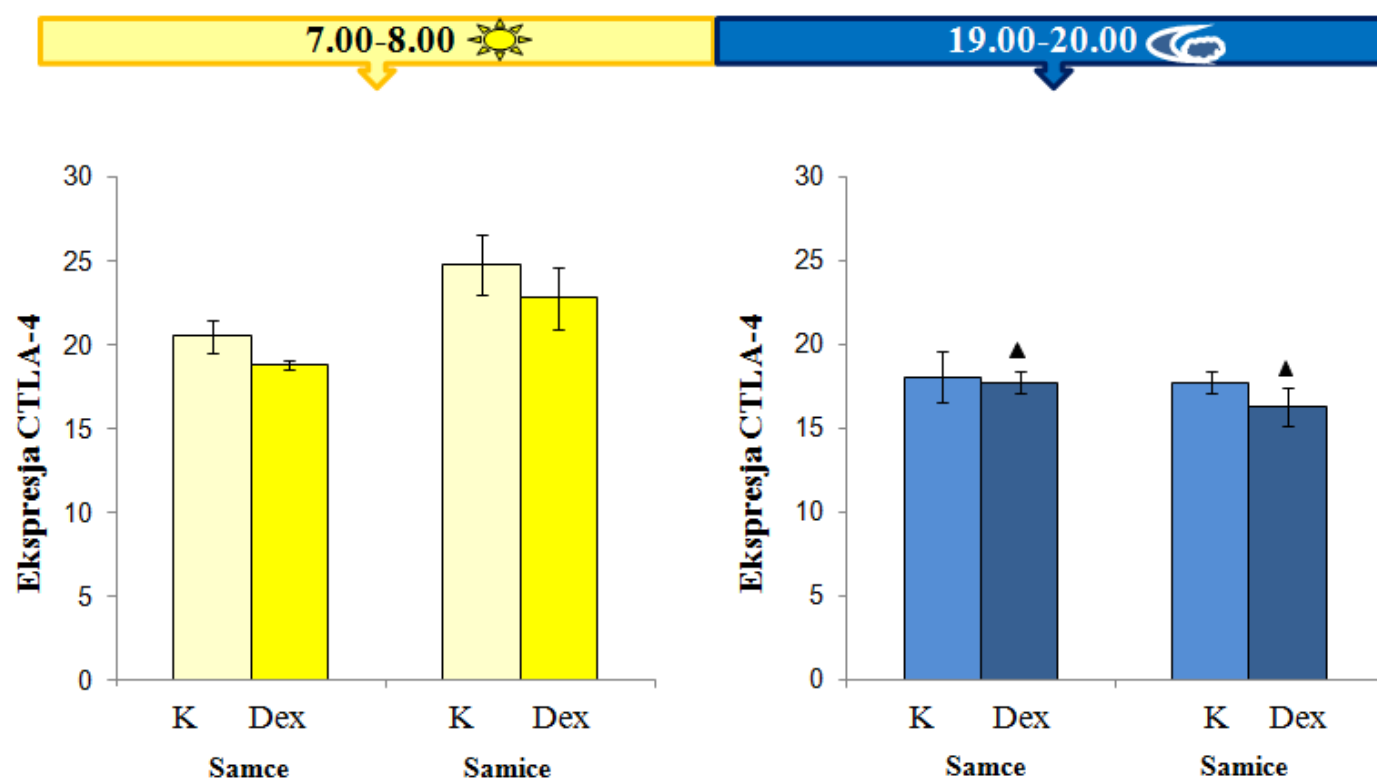
Odsetkowe zmiany w zawartości nTreg w grasicy mogą być wynikiem zmian w ich rozwoju lub mogą wynikać ze zmian w poziomie apoptozy poszczególnych populacji tymocytów, czego skutkiem będą zmiany w ich wzajemnych proporcjach. Według Berki i wsp. deksametazon powoduje apoptozę tymocytów, której poziom wzrasta wraz z zastosowaną dawką Dex [174]. Z kolei, Pazirandeh i wsp. dokumentują, że w zależności od stężenia glukokortykoidów, tymocyty mogą ulegać apoptozie lub proliferacji [233]. Zastosowana w eksperymentach własnych dawka Dex (1.25 mg/kg/dobę) powodowała wzrost komórek apoptotycznych w populacjach tymocytów DP, DN, SP CD4⁺, a także nTreg niezależnie od szczepu myszy i płci. Stwierdzono również, że tymocyty SP CD8⁺, DP i nTreg samic obu szczepów myszy charakteryzują się mniejszą wrażliwością na apoptotyczne działanie deksametazonu (**Ryc. 25**). Według doniesień innych badaczy, tymocyty samic są mniej wrażliwe na apoptozę GC-zależną [181, 182]. Żeńskie hormony płciowe – estrogeny w stężeniach fizjologicznych działają wzmacniająco na układ odpornościowy [181, 182] oraz stymulują proliferację i aktywność supresorową limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ [184]. Wyniki moich badań wskazują, że deksametazon indukuje apoptozę we wszystkich populacjach tymocytów, mimo to dochodzi do

zwiększenia odsetka limfocytów nTreg. Wyniki przedstawione w pracy wskazują, że zwiększeniu odsetka nTreg w grasicy myszy towarzyszy zwiększenie ekspresji receptorów dla glukokortykoidów w tych komórkach (**Ryc. 29**). Boldizar i wsp. w badaniach *in vivo* stwierdzili, że podanie myszom syntetycznych glukokortykoidów powoduje zmianę ekspresji receptora dla GC na poziomie syntezy mRNA oraz białka. Zaobserwowali, że po podaniu Dex, w populacji SP CD4+, SP CD8+ i DN poziom ekspresji GCR maleje, natomiast a tymocytach DP pozostaje bez zmian [180]. W naszych badaniach nie wykazano wpływu deksametazonu na poziom ekspresji GCR w badanych populacjach tymocytów. Deksametazon nie zmieniał rytmiczności GCR w tymocytach zależnej od pory dnia, a największą ekspresją receptorów dla GC charakteryzowały się limfocyty nTreg, niezależnie od pory dnia i szczepu myszy. Dodatkowym czynnikiem mogącym mieć wpływ na zwiększenie odsetka limfocytów nTreg w grasicy jest regulacja migracji dojrzałych tymocytów SP CD4+ i SP CD8+ do obwodowych narządów limfoidalnych przez Dex. Wykonane przeze mnie wstępne badania ekspresji selektyny CD62L, odpowiedzialnej za ukierunkowaną migrację tymocytów do obwodowych narządów limfoidalnych, wykazują zwiększenie ekspresji CD62L na wszystkich dojrzałych tymocytach. Zatem podejrzenie, że rytmiczne zmiany w odsetku nTreg w grasicy wynikają ze zróżnicowania kinetyki migracji nie wydają się słuszne, potwierdzając tym samym udział GC w procesie rytmiczności rozwoju nTreg.

6.4 Deksametazon zwiększa aktywność supresorową nTreg nie zmieniając jej rytmiczności obserwowanej w warunkach fizjologicznych

Podobnie jak w pierwszej części badań, zanalizowano aktywność supresorową jedynie limfocytów nTreg izolowanych z grasicy myszy C57BL/6. Wyniki badań *in vitro* opisanych przez Dao Nguyen i Robinson wskazują, że traktowanie limfocytów CD4+CD25+ syntetycznymi glukokortykoidami zwiększa ich aktywność supresorową wobec aktywowanych limfocytów SP CD4+CD25-, co przejawia się zahamowaniem ich proliferacji [142]. Wyniki badań przedstawione w tej pracy wskazują, że deksametazon powoduje zwiększenie aktywności supresorowej nTreg nie zakłócając rytmiczności zmian obserwowanych w warunkach fizjologicznych (**Ryc. 26**). Wykazano różnice w aktywności supresorowej nTreg myszy traktowanych deksametazonem zależne od płci. Większą aktywność supresorową wykazują nTreg pochodzące z grasic osobników płci żeńskiej. Analiza ekspresji CTLA-4 i LAG-3, istotnych dla funkcji nTreg markerów aktywacji, nie

wykazała zmian wywołanych traktowaniem deksametazonem (**Ryc. 32** i **Ryc. 33**). Być może, deksametazon wpływa na wzrost aktywności supresorowej nTreg przy udziale charakterystycznych dla nich cytokin, takich jak IL-10, IL-35 czy TGF- β [95, 99, 103], wymaga to jednak dalszych badań.



Ryc. 32 Ekspresja CTLA-4 na tymocytach CD4+CD25+ myszy C57BL/6 traktowanych deksametazonem

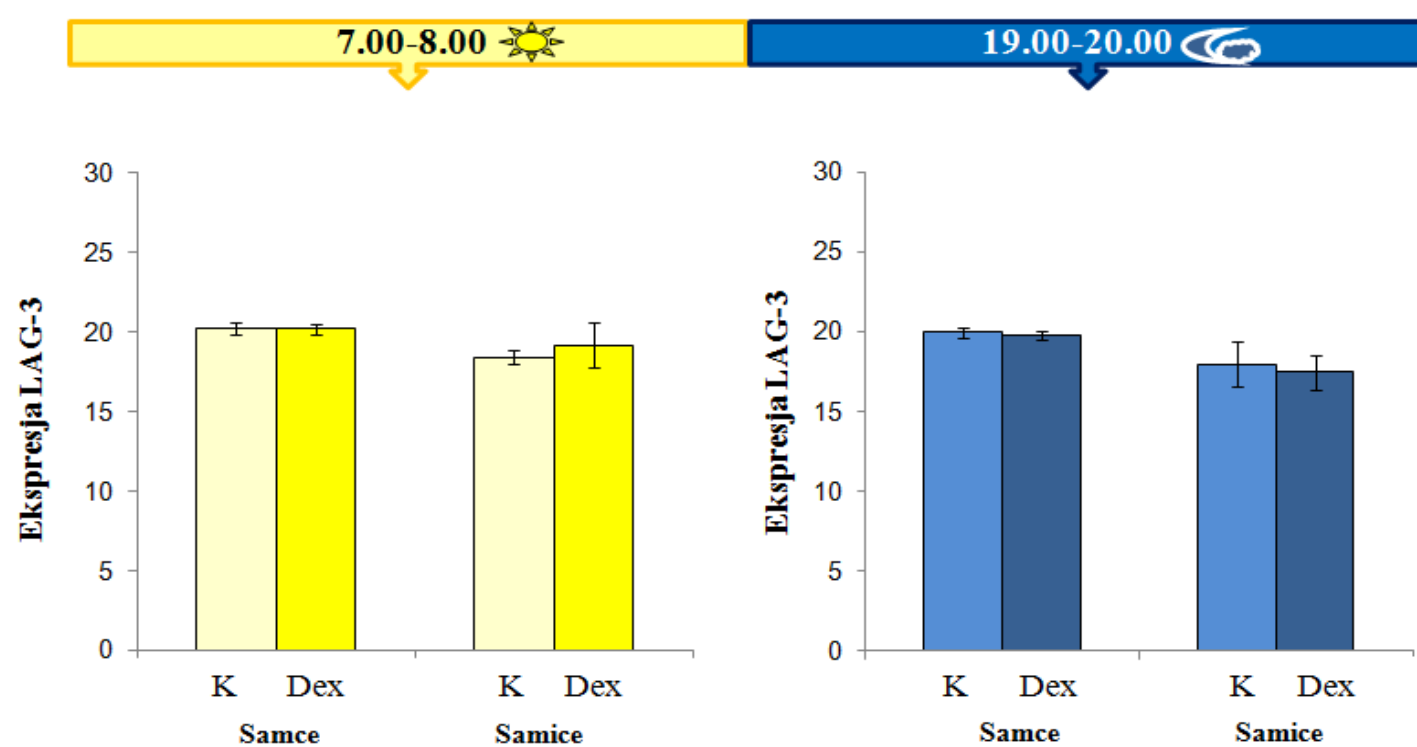
Ekspresja CTLA-4 w tymocytach CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 rano i wieczorem.

K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54). Istotność statystyczna:

w zależności od pory dnia:

▲ $p < 0,05$ samce rano vs samce wieczór
samice rano vs samice wieczór



Ryc. 33 Ekspresja LAG-3 na tymocytach CD4+CD25+ myszy C57BL/6 traktowanych deksametazonem

Ekspresja LAG-3 w tymocytach CD4+CD25+ samców i samic szczepu C57BL/6 rano i wieczorem.

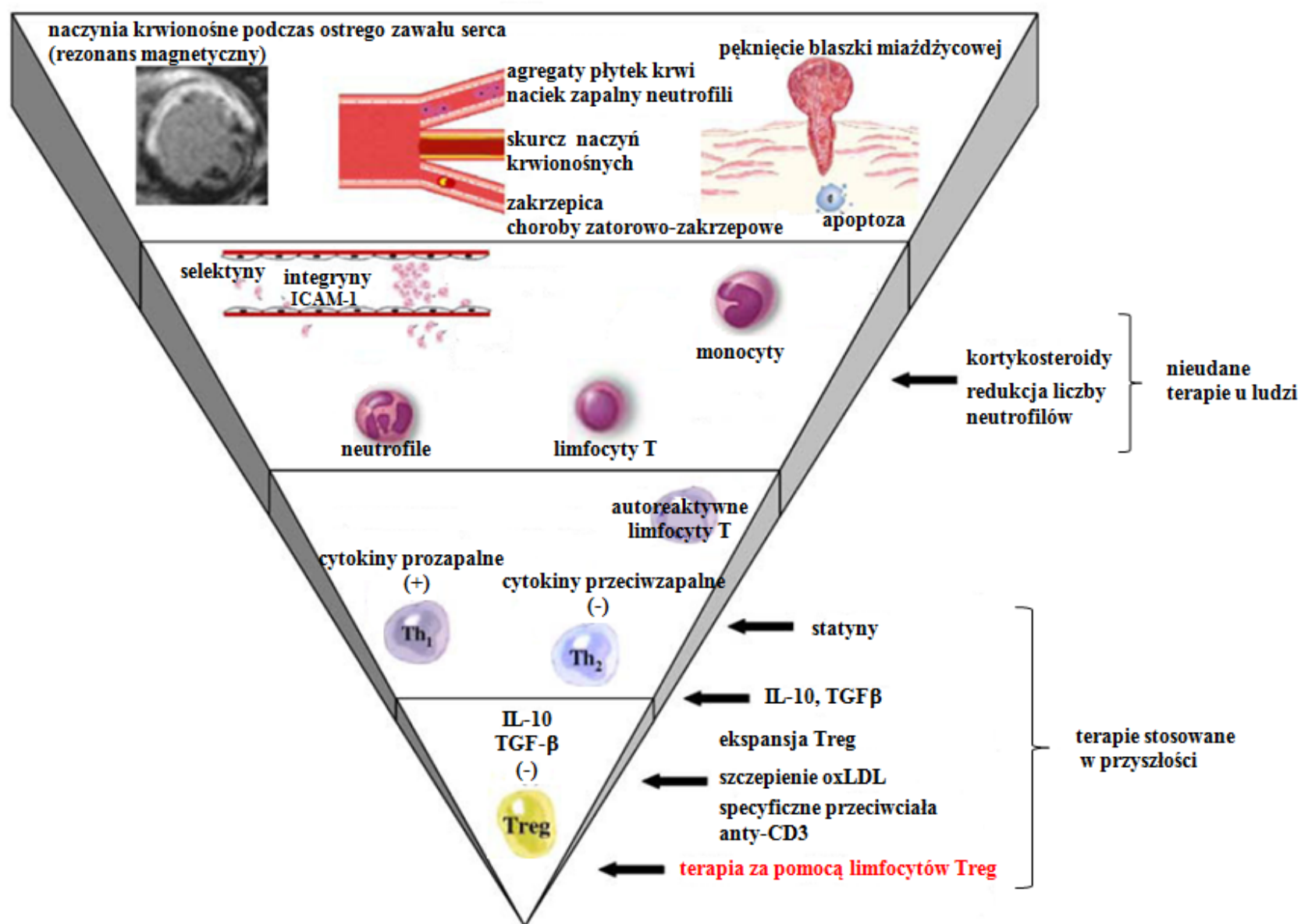
K – myszy nietraktowane deksametazonem; Dex – myszy traktowane deksametazonem;

Analiza statystyczna: trzy-czynnikowa ANOVA (patrz str. 54).

Podsumowując, wyniki naszych badań potwierdzają hipotezę zakładającą występowanie rytmiczności rozwoju nTreg zależną od pory dnia oraz udział glukokortykoidów w tym procesie.

Według doniesień literaturowych, sen oraz hormony syntetyzowane w rytmie dobowym wpływają na prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego [5, 197]. Udział glukokortykoidów w powstawaniu nTreg nie jest do końca poznany, a mechanizmy regulujące tymi procesami są nadal badane. Wyniki własnych badań przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują, że pora dnia i związane z nią zmiany stężenia endogennych GC, a także działanie egzogennych GC wpływają na rozwój i zawartość nTreg w grasicy oraz na ich aktywność supresorową, które zmieniają się w zależności od płci i typu odpowiedzi immunologicznej, Th1 lub Th2.

Limfocyty nTreg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ stanowią niewielką populację liczącą około 5% obwodowych limfocytów T CD4⁺ zarówno u myszy i ludzi, pełnią jednak ważną rolę w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego i tolerancji na własne antygeny [3, 61, 88]. Niedobór nTreg ułatwia indukcję chorób autoimmunizacyjnych, alergii i innych chorób związanych z nadmierną aktywnością układu odpornościowego. Limfocyty nTreg ze względu na swoje funkcje supresorowe i możliwość ich wykorzystania w terapii są przedmiotem intensywnych badań. Jednym z ciekawszych przykładów poszukiwania zastosowania nowych terapii z udziałem limfocytów Treg jest proponowany model „odwróconej piramidy” wyjaśniający negatywne skutki niekontrolowanej odpowiedzi zapalnej związanej z ostrym zawałem mięśnia sercowego – AMI (**Ryc. 34**) [234].

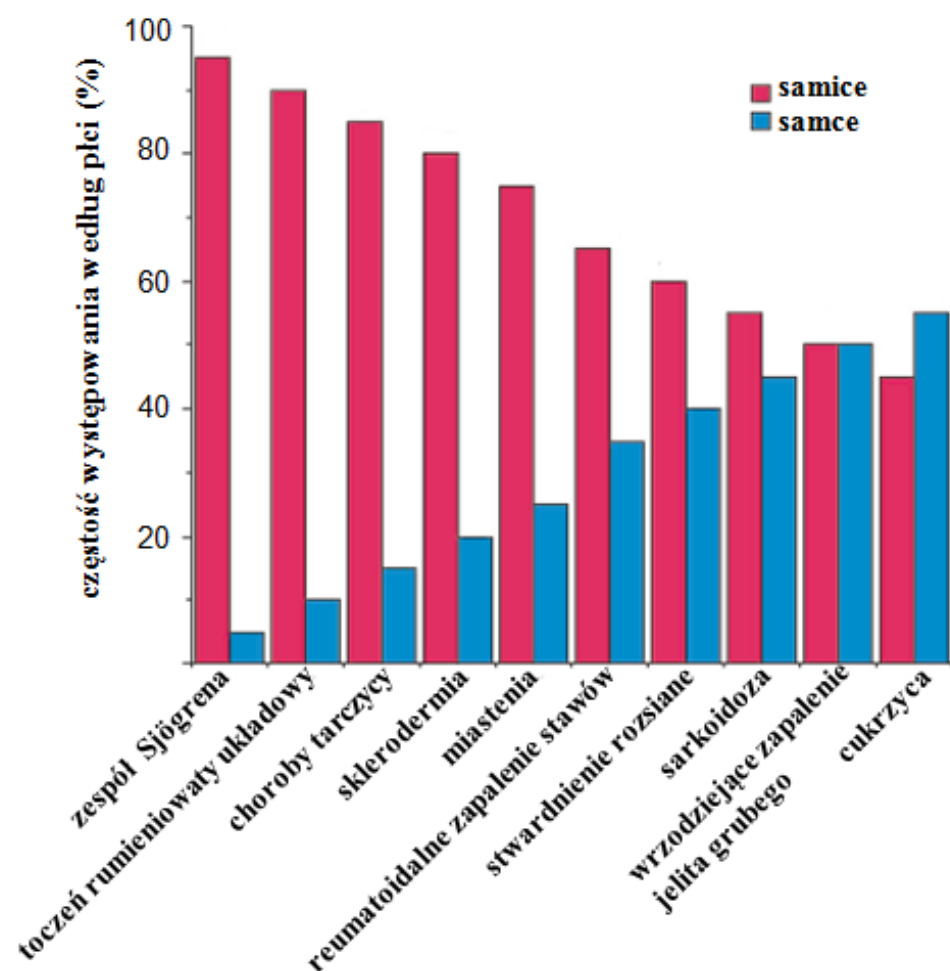


Ryc. 34 Model „odwróconej piramidy” - negatywne skutki niekontrolowanej odpowiedzi zapalnej związanej z ostrym zawałem mięśnia sercowego – AMI oraz sposoby skutecznego leczenia za pomocą terapii limfocytami Treg (według [234])

U pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego, osłabiona regulacja układu odpornościowego przez limfocyty Treg zaburza równowagę pomiędzy odpowiedzią Th1 i Th2 prowadząc do wzmocnienia aktywności limfocytów Th1 i autoagresywnych limfocytów T. Powododuje to zwiększenie ekspresji selektyn, integryn oraz cząsteczek adhezyjnych biorących udział w toczeniu, adhezji i migracji neutrofili, a w konsekwencji do uszkodzenia tkanek wynikającego z nacieku neutrofili. Aktywacja monocytów i limfocytów T pogarsza drożność naczyń w mikrokrazeniu w wyniku aktywacji agregacji płytek krwi, napływu neutrofilów, skurczu błony mięśniowej naczyń krwionośnych i zakrzepicy. Proteazy wydzielane przez monocyty mogą osłabiać włóknistą osłonkę blaszki miażdżycowej i przyczyniać się do występowania ostrych zespołów wieńcowych – ACS (acute coronary syndromes). Stosowane u ludzi sposoby terapii nadmiernej odpowiedzi immunologicznej (polegające na redukcji liczby neutrofili, czy wykorzystujące leki immunosupresyjne – kortykosteroidy) nie przyniosły pozytywnych skutków. Jednym z proponowanych modeli terapii mogłoby być wykorzystanie limfocytów Treg, np. 1/ w terapii komórkowej *in vitro* Treg – ekspansja limfocytów Treg uprzednio wyizolowanych od pacjenta w hodowli *in vitro*, 2/ proliferacja limfocytów Treg stymulowana w warunkach *in vivo* za pomocą swoistych przeciwciał anty-CD3, lub szczepień OxLDL (oksydowane lipoproteiny niskiej gęstości) lub blokowanie działania limfocytów Th1 za pomocą cytokin IL-10, TGF- β czy statyn będących symulacją działania supresorowego limfocytów Treg.

Bardzo ważnym komponentem odpowiedzi immunologicznej, rzadko uwzględnianym w praktyce klinicznej, jest zachowanie równowagi pomiędzy typem odpowiedzi Th1 a Th2. Rodzaj antygenów determinujących różnicowanie naiwnych limfocytów T CD4+ w określony typ limfocytów efektorowych, Th1 lub Th2, pozostaje nadal niewyjaśniony. Równowaga odpowiedzi Th1/Th2 jest ważna w utrzymaniu homeostazy układu odpornościowego. Zachorowalność na różne choroby autoimmunizacyjne również ma związek z zaburzeniem tej równowagi. Cytokiny IFN- γ i TNF, syntetyzowane przez limfocyty Th1, związane są z rozwojem takich chorób autoimmunizacyjnych jak stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów czy cukrzyca typu I. Natomiast cytokiny charakterystyczne dla odpowiedzi Th2, IL-4, IL-5 i IL-13 odpowiadają za rozwój i przebieg chorób alergicznych takich jak astma, nadwrażliwości pokarmowej czy też mogą przyczyniać się do bezsenności, co także prowadzi do zaburzenia regulacji w układzie odpornościowym [235-238].

Typ odpowiedzi immunologicznej oraz podatność na różne choroby autoimmunizacyjne zależy od płci (**Ryc. 35**) [239]. Według badań samce charakteryzują się większą odpowiedzią humoralną Th2, a samice większą aktywnością odpowiedzi komórkowej Th1 [240-243]. Według doniesień układ odpornościowy kobiet jest bardziej aktywny niż mężczyzn i w konsekwencji bardziej podatny na choroby autoimmunizacyjne [244]. Na zmianę równowagi odpowiedzi Th1/Th2 wpływa nie tylko płeć, ale także wiek czy tryb życia. U osób starszych, czy ludzi z zaburzeniami snu (cyklu dobowego) dochodzi do przewagi odpowiedzi typu Th2 [245-247].

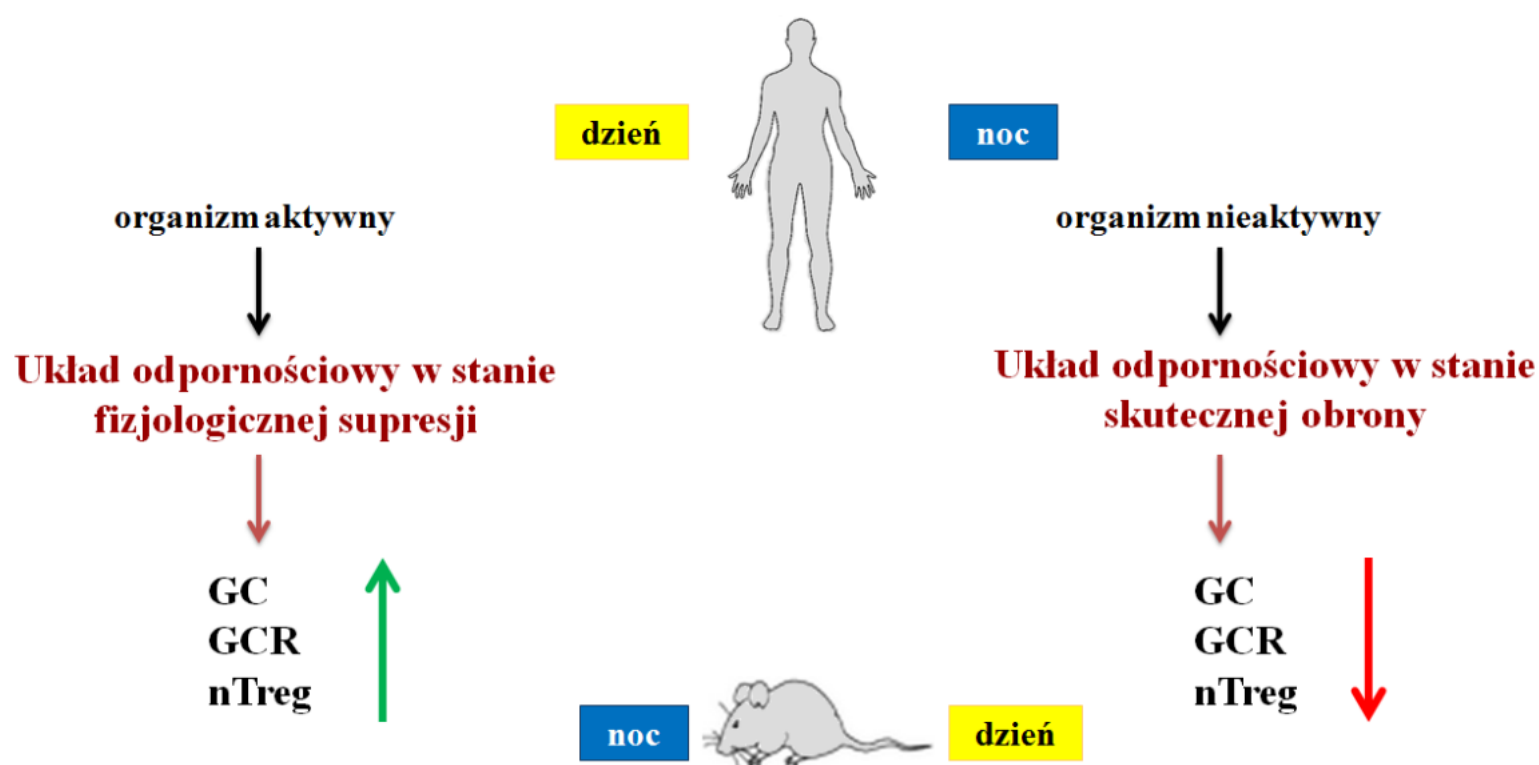


Ryc. 35 Występowanie chorób autoimmunizacyjnych u ludzi w zależności od płci (według [239])

W ciągu ostatnich lat, panujący styl życia doprowadził do stałego spadku średniego czasu snu. Szacuje się, że w USA i Europie około 15-20% ludności pracuje w nocy [248], co skutkuje skróceniem czasu snu [249]. Wyniki badań wskazują, że zarówno u 1.100.000 kobiet i mężczyzn z wydłużonym lub skróconym czasem snu występuje podwyższone ryzyko śmierci [250]. Istnieje wiele dowodów, że przewlekłe zaburzenia snu mają szkodliwy wpływ na zdrowie i długość życia. Panuje powszechne przekonanie, poparte badaniami, że brak snu zwiększa podatność człowieka i zwierząt na infekcje [251, 252]. Odpowiednia długość snu, zachowanie rytmu dobowego i związanych z nim zmian syntezy hormonów wpływa na prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego.

Zjawisko rytmiczności aktywności układu odpornościowego jest najczęściej zaniechane w procedurach klinicznych dotyczących m.in. szczepień czy terapii immunosupresyjnej. Wyniki badań wskazują, że przy prawidłowym rytmie dobowym, odpowiedniej długości snu, limfocyty CD4+CD25- proliferują znacznie intensywniej [197]. Przy zaburzeniu snu występuje osłabiona odpowiedź układu odpornościowego na szczepienie przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu A [253]. Pora dnia wpływa również na skuteczność szczepień. Zaobserwowano, że szczepienie przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu B w godzinach popołudniowych miało większą skuteczność ocenianą na podstawie miana surowicy pacjentów w porównaniu ze szczepieniem rano. Podczas snu,

kiedy organizm jest w stanie spoczynku obserwuje się nasilenie aktywności układu odpornościowego. Układ odpornościowy w tym czasie skutecznie broni organizm przed patogenami (**Ryc. 36**). Jego aktywność wzmagana jest przez hormony wydzielane podczas snu, takie jak melatonina czy prolaktyna wykazujące właściwości immunostymulujące [254, 255]. Natomiast, kiedy organizm jest aktywny funkcje układu odpornościowego ulegają zahamowaniu. Fazy aktywności układu odpornościowego korelują z dobowym rytmem syntezy endogennych glukokortykoidów. Przedstawione w rozprawie wyniki badań potwierdzają hipotezę badawczą zakładającą udział GC, receptorów dla GC i nTreg w mechanizmie odpowiedzialnym za rytmiczność aktywności układu odpornościowego. Podanie deksametazonu o tej porze dodatkowo wzmacnia jego supresyjne działanie.



Ryc. 36 Proponowany mechanizm regulacji aktywności układu odpornościowego zależnie od pory dnia [opis w tekście]

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej wskazują na rolę nTreg i regulacji z udziałem osi HPA w rytmiczności aktywności układu odpornościowego ssaków zależnej od pory dnia z jednoczesnym uwzględnieniem dymorfizmu płciowego układu odpornościowego i typu odpowiedzi immunologicznej. Poznanie mechanizmu działania GC na rozwój, przeżywalność i funkcje limfocytów nTreg może przyczynić się do opracowania bardziej skutecznych terapii chorób związanych z nadmierną lub nieprawidłowo skierowaną odpowiedzią immunologiczną. Wyniki badań przedstawionych w rozprawie wskazują na istotną rolę typu odpowiedzi, płci i rytmiczności funkcjonowania układu odpornościowego, co powinno być uwzględniane w planowaniu indywidualnych dla każdego pacjenta terapii.

7. WNIOSKI

1. Rozwój i aktywność supresorowa limfocytów nTreg w grasicy wykazuje rytmiczność zależną od pory dnia, płci i typu odpowiedzi immunologicznej:
 - ✓ wieczorem wykazano zwiększenie odsetka limfocytów nTreg w grasicy oraz wzrost ich funkcji supresorowej
 - ✓ samce charakteryzują się większym odsetkiem i aktywnością supresorową nTreg wieczorem
 - ✓ kinetyka rozwoju nTreg wykazuje zmienność zależną od typu odpowiedzi immunologicznej Th1 lub Th2
2. Działanie syntetycznego glukokortykoidu – deksametazonu powoduje zwiększenie odsetka nTreg w grasicy i ich aktywności supresorowej przy zachowaniu rytmiczności zależnej od pory dnia obserwowanej w warunkach fizjologicznych
3. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do proponowania generalnego mechanizmu odpowiedzialnego za rytmiczne zmiany w aktywności układu odpornościowego ssaków, w którym kluczową rolę odgrywają limfocyty nTreg, których rozwój i funkcja supresorowa podlega regulacji przez GC za pośrednictwem GCR.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Sakaguchi, S. and F. Powrie, *Emerging challenges in regulatory T cell function and biology*. Science, 2007. **317**(5838): p. 627-9.
2. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
3. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
4. Sakaguchi, S., K. Wing, and M. Miyara, *Regulatory T cells - a brief history and perspective*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S116-23.
5. Born, J., et al., *Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells*. J Immunol, 1997. **158**(9): p. 4454-64.
6. Duguay, D. and N. Cermakian, *The crosstalk between physiology and circadian clock proteins*. Chronobiol Int, 2009. **26**(8): p. 1479-513.
7. Guilding, C. and H.D. Piggins, *Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?* Eur J Neurosci, 2007. **25**(11): p. 3195-216.
8. Hastings, M., J.S. O'Neill, and E.S. Maywood, *Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms*. J Endocrinol, 2007. **195**(2): p. 187-98.
9. Dickmeis, T., *Glucocorticoids and the circadian clock*. J Endocrinol, 2009. **200**(1): p. 3-22.
10. Grossman, C.J., *Interactions between the gonadal steroids and the immune system*. Science, 1985. **227**(4684): p. 257-61.
11. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
12. Bluestone, J.A. and Q. Tang, *How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity?* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 638-42.
13. von Herrath, M.G. and L.C. Harrison, *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 223-32.
14. Saito, S., Y. Sasaki, and M. Sakai, *CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy*. J Reprod Immunol, 2005. **65**(2): p. 111-20.
15. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nat Immunol. **11**(1): p. 7-13.
16. Wang, R.F., *Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(2): p. 106-14.
17. McHugh, R.S. and E.M. Shevach, *The role of suppressor T cells in regulation of immune responses*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(5): p. 693-702.
18. Shevach, E.M., et al., *The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 60-73.
19. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
20. Groux, H. and F. Powrie, *Regulatory T cells and inflammatory bowel disease*. Immunol Today, 1999. **20**(10): p. 442-5.
21. Suci-Foca, N., J.S. Manavalan, and R. Cortesini, *Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells*. Transpl Immunol, 2003. **11**(3-4): p. 235-44.

22. Sharif, S., et al., *Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells*. J Mol Med (Berl), 2002. **80**(5): p. 290-300.
23. Josefowicz, S.Z. and A. Rudensky, *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 616-25.
24. Groux, H., *An overview of regulatory T cells*. Microbes Infect, 2001. **3**(11): p. 883-9.
25. Rajasagi, M., et al., *CD44 promotes progenitor homing into the thymus and T cell maturation*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(2): p. 251-61.
26. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui, *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 9-21.
27. Taghon, T. and E.V. Rothenberg, *Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha-beta and TCR-gammadelta T cell development*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 383-98.
28. Wada, H., et al., *Adult T-cell progenitors retain myeloid potential*. Nature, 2008. **452**(7188): p. 768-72.
29. Kawamoto, H., *A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages*. Trends Immunol, 2006. **27**(4): p. 169-75.
30. Narayan, K. and J. Kang, *Molecular events that regulate alphabeta versus gammadelta T cell lineage commitment: old suspects, new players and different game plans*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 169-75.
31. Aifantis, I., et al., *Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 159-69.
32. Hayday, A.C. and D.J. Pennington, *Key factors in the organized chaos of early T cell development*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 137-44.
33. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
34. Lowenberg, M., et al., *Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands*. Steroids, 2008. **73**(9-10): p. 1025-9.
35. Herold, M.J., K.G. McPherson, and H.M. Reichardt, *Glucocorticoids in T cell apoptosis and function*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(1): p. 60-72.
36. Kisielow, P., *Development and selection of T cells: how many subsets? How many rules?* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003. **51**(6): p. 407-14.
37. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
38. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
39. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
40. Liston, A. and A.Y. Rudensky, *Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 176-85.
41. Pennington, D.J., et al., *Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1073-7.
42. Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus*. Nat Rev Immunol. **12**(3): p. 157-67.
43. Pacholczyk, R., et al., *Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 493-504.

44. Fontenot, J.D., et al., *Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 901-6.
45. Tuovinen, H., et al., *Cutting edge: human CD4-CD8- thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3651-4.
46. Yi, H., et al., *The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(3): p. 189-95.
47. Zhang, Z., et al., *Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2190-7.
48. Nakase, K., et al., *Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Exp Hematol, 2002. **30**(4): p. 313-7.
49. Akimova, T., et al., *Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation*. PLoS One. **6**(8): p. e24226.
50. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
51. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
52. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
53. Bruder, D., et al., *Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 623-30.
54. Weiss, J.M., et al., *Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells*. J Exp Med. **209**(10): p. 1723-42, S1.
55. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. J Exp Med. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
56. Antony, P.A., et al., *Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5255-66.
57. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
58. Walsh, P.T., et al., *PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+CD25+ Tregs*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2521-31.
59. Malek, T.R. and A.L. Bayer, *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(9): p. 665-74.
60. Baecher-Allan, C., et al., *CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1245-53.
61. Wing, K., et al., *Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood*. Immunology, 2002. **106**(2): p. 190-9.
62. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
63. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
64. Schubert, L.A., et al., *Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37672-9.
65. Le Bras, S. and R.S. Geha, *IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1473-5.
66. Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1713-22.

67. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
68. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, *Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice*. Science, 1969. **166**(3906): p. 753-5.
69. Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 766-70.
70. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
71. Vrabelova, Z., et al., *CD 127- and FoxP3⁺ expression on CD25⁺CD4⁺ T regulatory cells upon specific diabetogenic stimulation in high-risk relatives of type 1 diabetes mellitus patients*. Scand J Immunol, 2008. **67**(4): p. 404-10.
72. Bopp, T., et al., *NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4⁺ T lymphocytes by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 181-7.
73. Oh-Hora, M., et al., *Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 432-43.
74. Sauer, S., et al., *T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7797-802.
75. Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist, *The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells*. J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 565-74.
76. Delgoffe, G.M., et al., *The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2*. Nat Immunol. **12**(4): p. 295-303.
77. Ouyang, W., et al., *Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells*. Nat Immunol. **11**(7): p. 618-27.
78. Kerdiles, Y.M., et al., *Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function*. Immunity. **33**(6): p. 890-904.
79. Harada, Y., et al., *Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells*. J Exp Med. **207**(7): p. 1381-91.
80. Wirnsberger, G., F. Mair, and L. Klein, *Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10278-83.
81. Long, M., et al., *Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 921-31.
82. Ruan, Q., et al., *Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 932-40.
83. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature. **463**(7282): p. 808-12.
84. Li, B. and M.I. Greene, *Special regulatory T-cell review: FOXP3 biochemistry in regulatory T cells--how diverse signals regulate suppression*. Immunology, 2008. **123**(1): p. 17-9.
85. Chen, C., et al., *Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36828-34.

86. Wu, Y., et al., *FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT*. Cell, 2006. **126**(2): p. 375-87.
87. Ho, L. and G. Crabtree, *A Foxy tango with NFAT*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 906-8.
88. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler, *Human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 89-98.
89. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
90. Trzonkowski, P., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans-impact of immunosenescence*. Clin Immunol, 2006. **119**(3): p. 307-16.
91. Levings, M.K., et al., *Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1335-46.
92. Tang, Q., et al., *Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3348-52.
93. Jiang, S., et al., *Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells?* Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1193-200.
94. Ng, W.F., et al., *Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2736-44.
95. Pontoux, C., A. Banz, and M. Papiernik, *Natural CD4 CD25(+) regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10*. Int Immunol, 2002. **14**(2): p. 233-9.
96. Kingsley, C.I., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1080-6.
97. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
98. Piccirillo, C.A., et al., *CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness*. J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 237-46.
99. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
100. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
101. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-44.
102. Zheng, S.G., et al., *Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5213-21.
103. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
104. Gavin, M.A., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 771-5.

105. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
106. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, 2004. **104**(9): p. 2840-8.
107. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-23.
108. Herman, A.E., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1479-89.
109. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
110. Ren, X., et al., *Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 2076-84.
111. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
112. Yu, A., et al., *A low interleukin-2 receptor signaling threshold supports the development and homeostasis of T regulatory cells*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 204-17.
113. Thornton, A.M., et al., *Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6519-23.
114. Oberle, N., et al., *Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3578-87.
115. Tran, D.Q., et al., *Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2929-38.
116. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
117. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
118. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
119. Zarek, P.E., et al., *A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells*. Blood, 2008. **111**(1): p. 251-9.
120. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
121. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.

122. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
123. Onishi, Y., et al., *Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10113-8.
124. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
125. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
126. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
127. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
128. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
129. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
130. Romagnani, S., *Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders?* Allergy, 2006. **61**(1): p. 3-14.
131. Sasada, T., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression*. Cancer, 2003. **98**(5): p. 1089-99.
132. Brusko, T.M., et al., *Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1407-14.
133. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
134. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
135. Miyara, M., et al., *Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8392-400.
136. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
137. Fattorossi, A., et al., *Circulating and thymic CD4 CD25 T regulatory cells in myasthenia gravis: effect of immunosuppressive treatment*. Immunology, 2005. **116**(1): p. 134-41.
138. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 18-32.
139. Rouse, B.T., *Regulatory T cells in health and disease*. J Intern Med, 2007. **262**(1): p. 78-95.
140. Chen, X., et al., *Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE*. Eur J Immunol, 2006. **36**(8): p. 2139-49.
141. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1425-33.
142. Dao Nguyen, X. and D.S. Robinson, *Fluticasone propionate increases CD4CD25 T regulatory cell suppression of allergen-stimulated CD4CD25 T cells by an IL-10-dependent mechanism*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(2): p. 296-301.

143. Suttmuller, R.P., R. Offringa, and C.J. Melief, *Revival of the regulatory T cell: new targets for drug development*. Drug Discov Today, 2004. **9**(7): p. 310-6.
144. Adorini, L., N. Giarratana, and G. Penna, *Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 127-34.
145. Jondal, M., A. Pazirandeh, and S. Okret, *Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis?* Trends Immunol, 2004. **25**(11): p. 595-600.
146. Stoffel-Wagner, B., *Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1007**: p. 64-78.
147. Cima, I., et al., *Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation*. J Exp Med, 2004. **200**(12): p. 1635-46.
148. Qiao, S., et al., *Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes*. Exp Cell Res, 2008. **314**(16): p. 3027-35.
149. Rhen, T. and J.A. Cidlowski, *Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1711-23.
150. Sapolsky, R.M., L.M. Romero, and A.U. Munck, *How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 55-89.
151. Besedovsky, H.O. and A. del Rey, *The cytokine-HPA axis feed-back circuit*. Z Rheumatol, 2000. **59 Suppl 2**: p. II/26-30.
152. Vegiopoulos, A. and S. Herzig, *Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 43-61.
153. Stahn, C., et al., *Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **275**(1-2): p. 71-8.
154. Scudeletti, M., et al., *New glucocorticoids. Mechanisms of immunological activity at the cellular level and in the clinical setting*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **595**: p. 368-82.
155. Addison, T., *On the constitutional and local effects of disease of the supra-renal capsules*. London, 1855.
156. Buttgereit, F., et al., *The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol, 2005. **34**(1): p. 14-21.
157. Herr, I. and J. Pfitzenmaier, *Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 425-30.
158. Schmidt, S., et al., *Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S45-55.
159. Steinman, L., *Elaborate interactions between the immune and nervous systems*. Nat Immunol, 2004. **5**(6): p. 575-81.
160. Liberman, A.C., et al., *Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 45-56.
161. Necela, B.M. and J.A. Cidlowski, *Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 239-46.
162. De Bosscher, K. and G. Haegeman, *Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(3): p. 281-91.

163. Franchimont, D., *Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1024**: p. 124-37.
164. Walsh, G.M., D.W. Sexton, and M.G. Blaylock, *Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma*. J Endocrinol, 2003. **178**(1): p. 37-43.
165. Zhang, X., et al., *Divergent effect of mometasone on human eosinophil and neutrophil apoptosis*. Life Sci, 2002. **71**(13): p. 1523-34.
166. Sampson, A.P., *The role of eosinophils and neutrophils in inflammation*. Clin Exp Allergy, 2000. **30 Suppl 1**: p. 22-7.
167. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*. Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
168. Fearon, D.T. and R.M. Locksley, *The instructive role of innate immunity in the acquired immune response*. Science, 1996. **272**(5258): p. 50-3.
169. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
170. Elenkov, I.J., et al., *Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications*. Proc Assoc Am Physicians, 1996. **108**(5): p. 374-81.
171. Blotta, M.H., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes*. J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5589-95.
172. Elenkov, I.J., *Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1024**: p. 138-46.
173. Pazirandeh, A., M. Jondal, and S. Okret, *Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic-derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2501-7.
174. Berki, T., et al., *Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations*. Int Immunol, 2002. **14**(5): p. 463-9.
175. Braitch, M., et al., *Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2009. **119**(4): p. 239-45.
176. Chen, X., et al., *Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 859-69.
177. D'Elia, M., J. Patenaude, and J. Bernier, *Regulation of glucocorticoid sensitivity in thymocytes from burn-injured mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(1): p. E97-104.
178. Palinkas, L., et al., *Developmental shift in TcR-mediated rescue of thymocytes from glucocorticoid-induced apoptosis*. Immunobiology, 2008. **213**(1): p. 39-50.
179. Kowalik, A., et al., *Dexamethasone-FITC staining application for measurement of circadian rhythmicity of glucocorticoid receptor expression in mouse living thymocyte subsets*. J Neuroimmunol.
180. Boldizsar, F., et al., *Low glucocorticoid receptor (GR), high Dig2 and low Bcl-2 expression in double positive thymocytes of BALB/c mice indicates their endogenous glucocorticoid hormone exposure*. Immunobiology, 2006. **211**(10): p. 785-96.
181. Olsen, N.J. and W.J. Kovacs, *Gonadal steroids and immunity*. Endocr Rev, 1996. **17**(4): p. 369-84.
182. McMurray, R.W., et al., *Progesterone inhibits glucocorticoid-induced murine thymocyte apoptosis*. Int J Immunopharmacol, 2000. **22**(11): p. 955-65.

183. Chen, Y., et al., *Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis*. *Faseb J.* **24**(12): p. 5043-51.
184. Prieto, G.A. and Y. Rosenstein, *Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation*. *Immunology*, 2006. **118**(1): p. 58-65.
185. Reddy, J., et al., *Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5591-5.
186. Xie, Y., et al., *A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vivo and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. **41**(9): p. 781-91.
187. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7618-24.
188. Arjona, A. and D.K. Sarkar, *Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function*. *Brain Behav Immun*, 2006. **20**(5): p. 469-76.
189. Keller, M., et al., *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(50): p. 21407-12.
190. Hayashi, M., S. Shimba, and M. Tezuka, *Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages*. *Biol Pharm Bull*, 2007. **30**(4): p. 621-6.
191. Malisch, J.L., et al., *Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior*. *Gen Comp Endocrinol*, 2008. **156**(2): p. 210-7.
192. Karssen, A.M., et al., *Low doses of dexamethasone can produce a hypocorticosteroid state in the brain*. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5587-95.
193. Gomez, F., E.R. De Kloet, and A. Armario, *Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(2 Pt 2): p. R420-7.
194. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. *J Immunol Methods*, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
195. Hawkins, E.D., et al., *Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(9): p. 2057-67.
196. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(9): p. 2049-56.
197. Bollinger, T., et al., *Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **155**(2): p. 231-8.
198. Dimitrov, S., et al., *Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets*. *Blood*, 2009. **113**(21): p. 5134-43.
199. Bollinger, T., et al., *Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells*. *PLoS One*. **6**(12): p. e29801.
200. Prendergast, B.J., et al., *Winter day lengths enhance T lymphocyte phenotypes, inhibit cytokine responses, and attenuate behavioral symptoms of infection in laboratory rats*. *Brain Behav Immun*, 2007. **21**(8): p. 1096-108.
201. Carreno, P.C., et al., *Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors*. *J Neuroimmunol*, 2005. **160**(1-2): p. 135-45.
202. Weigent, D.A., *Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin*. *Pharmacol Ther*, 1996. **69**(3): p. 237-57.

203. Hirokawa, K., M. Utsuyama, and S. Kobayashi, *Hypothalamic control of development and aging of the thymus*. Mech Ageing Dev, 1998. **100**(2): p. 177-85.
204. Amadori, A., et al., *Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans*. Nat Med, 1995. **1**(12): p. 1279-83.
205. Tugume, S.B., et al., *Hematological reference ranges among healthy Ugandans*. Clin Diagn Lab Immunol, 1995. **2**(2): p. 233-5.
206. Menard, D., et al., *Immunohematological reference ranges for adults from the Central African Republic*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(3): p. 443-5.
207. Uppal, S.S., S. Verma, and P.S. Dhot, *Normal values of CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy indian adults and the effects of sex, age, ethnicity, and smoking*. Cytometry B Clin Cytom, 2003. **52**(1): p. 32-6.
208. Jiang, W., et al., *Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(4): p. 811-3.
209. Jentsch-Ullrich, K., et al., *Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study*. Clin Immunol, 2005. **116**(2): p. 192-7.
210. Ho, P.C., G.W. Tang, and J.W. Lawton, *Lymphocyte subsets in patients with oestrogen deficiency*. J Reprod Immunol, 1991. **20**(1): p. 85-91.
211. Pender, M.P., et al., *CD8 T cell deficiency impairs control of Epstein--Barr virus and worsens with age in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry. **83**(3): p. 353-4.
212. Comans-Bitter, W.M., et al., *Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations*. J Pediatr, 1997. **130**(3): p. 388-93.
213. Hall, M.A., et al., *Genetic influence on peripheral blood T lymphocyte levels*. Genes Immun, 2000. **1**(7): p. 423-7.
214. Pinchuk, L.M. and N.M. Filipov, *Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice*. Immun Ageing, 2008. **5**: p. 1.
215. Chen, X., J.J. Oppenheim, and O.M. Howard, *BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 114-21.
216. Murakami, M., et al., *CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8832-7.
217. Bollinger, T., et al., *The influence of regulatory T cells and diurnal hormone rhythms on T helper cell activity*. Immunology. **131**(4): p. 488-500.
218. Stassen, M., et al., *Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 267-74.
219. Liu, T., et al., *Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6638-45.
220. Morelli, A.E., H. Hackstein, and A.W. Thomson, *Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation*. Semin Immunol, 2001. **13**(5): p. 323-35.
221. Min, W.P., et al., *Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1304-12.
222. Adorini, L., et al., *Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases*. J Cell Biochem, 2003. **88**(2): p. 227-33.

223. Dinesh, R.K., B.H. Hahn, and R.P. Singh, *Gender and Sex Hormones Influence CD4 Regulatory T Cells and Their Expression of FoxP3 in Healthy People and in SLE*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(10): P. 1257.
224. Afshan, G., N. Afzal, and S. Qureshi, *CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases*. Clin Lab. **58**(5-6): p. 567-71.
225. Lipoldova, M., et al., *Exogenous interleukin-2 abrogates differences in the proliferative responses to T cell mitogens among inbred strains of mice*. Cell Immunol, 1992. **142**(1): p. 177-85.
226. Malek, T.R., et al., *CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 167-78.
227. Geiger, S.M., et al., *Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of Angiostrongylus costaricensis infection*. Acta Trop, 2001. **80**(1): p. 59-68.
228. Vacchio, M.S. and J.D. Ashwell, *Glucocorticoids and thymocyte development*. Semin Immunol, 2000. **12**(5): p. 475-85.
229. Ashwell, J.D., F.W. Lu, and M.S. Vacchio, *Glucocorticoids in T cell development and function**. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 309-45.
230. Dimitrov, S., et al., *Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans*. Brain Behav Immun, 2004. **18**(4): p. 341-8.
231. Offner, H. and A.A. Vandenbark, *Congruent effects of estrogen and T-cell receptor peptide therapy on regulatory T cells in EAE and MS*. Int Rev Immunol, 2005. **24**(5-6): p. 447-77.
232. van Kooten, C., et al., *Handbook of experimental pharmacology "dendritic cells": the use of dexamethasone in the induction of tolerogenic DCs*. Handb Exp Pharmacol, 2009(188): p. 233-49.
233. Pazirandeh, A., M. Jondal, and S. Okret, *Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2392-401.
234. Bodi, V., et al., *Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction: unraveling the thread*. Am Heart J, 2008. **156**(6): p. 1065-73.
235. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
236. Wekerle, H., *Tackling multiple sclerosis*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 39-40.
237. Steinman, L., et al., *Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy*. Annu Rev Neurosci, 2002. **25**: p. 491-505.
238. Sakami, S., et al., *Coemergence of insomnia and a shift in the Th1/Th2 balance toward Th2 dominance*. Neuroimmunomodulation, 2002. **10**(6): p. 337-43.
239. Whitacre, C.C., *Sex differences in autoimmune disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 777-80.
240. Huygen, K. and K. Palfliet, *Strain variation in interferon gamma production of BCG-sensitized mice challenged with PPD II. Importance of one major autosomal locus and additional sexual influences*. Cell Immunol, 1984. **85**(1): p. 75-81.
241. Kantarci, O.H., et al., *Interferon gamma allelic variants: sex-biased multiple sclerosis susceptibility and gene expression*. Arch Neurol, 2008. **65**(3): p. 349-57.
242. Moldovan, I.R., et al., *Multiple sclerosis patients show sexual dimorphism in cytokine responses to myelin antigens*. J Neuroimmunol, 2008. **193**(1-2): p. 161-9.

243. Pelfrey, C.M., et al., *Sex differences in cytokine responses to myelin peptides in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2002. **130**(1-2): p. 211-23.
244. Libert, C., L. Dejager, and I. Pinheiro, *The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference*. Nat Rev Immunol. **10**(8): p. 594-604.
245. Lio, D., et al., *In vitro treatment with interleukin-2 normalizes type-1 cytokine production by lymphocytes from elderly*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2000. **22**(2): p. 195-203.
246. Van Cauter, E., R. Leproult, and L. Plat, *Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men*. Jama, 2000. **284**(7): p. 861-8.
247. Redwine, L., et al., *Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity in alcoholics*. Psychosom Med, 2003. **65**(1): p. 75-85.
248. Willyard, C., *Hungry for sleep*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 477-80.
249. Ursin, R., V. Baste, and B.E. Moen, *Sleep duration and sleep-related problems in different occupations in the Hordaland Health Study*. Scand J Work Environ Health, 2009. **35**(3): p. 193-202.
250. Kripke, D.F., et al., *Mortality associated with sleep duration and insomnia*. Arch Gen Psychiatry, 2002. **59**(2): p. 131-6.
251. Mohren, D.C., et al., *Prevalence of common infections among employees in different work schedules*. J Occup Environ Med, 2002. **44**(11): p. 1003-11.
252. Everson, C.A. and L.A. Toth, *Systemic bacterial invasion induced by sleep deprivation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(4): p. R905-16.
253. Bryant, P.A., J. Trinder, and N. Curtis, *Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 457-67.
254. Carrillo-Vico, A., et al., *A review of the multiple actions of melatonin on the immune system*. Endocrine, 2005. **27**(2): p. 189-200.
255. Yu-Lee, L.Y., *Prolactin modulation of immune and inflammatory responses*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 435-55.